

藻蓝蛋白复合物对酒精性肝损伤的保护作用

索有瑞^{1*}, 杨芳^{1,2}, 王洪伦¹, 李春婷^{1,2}

¹中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; ²中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要: 本文对藻蓝蛋白复合物保护化学性肝损伤的增效学进行了研究。以 Wistar 大鼠建立酒精性肝损伤模型, 将藻蓝蛋白复合物分为高、中、低三个剂量组, 以联苯双酯作为阳性对照组, 灌胃给药 42 d, 分别测定血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、血清丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽 (GSH)、肝匀浆丙二醛 (MDA) 和谷胱甘肽 (GSH) 的含量, 并对肝脏切片进行病理检查。结果表明: 藻蓝蛋白复合物对血清 ALT、AST 具有显著的抑制作用, 显著拮抗肝脏 MDA 的升高, 显著提高肝脏 GSH-Px 含量。出现肝细胞水肿、脂肪变性、点状坏死的大鼠数目极少。从而表明藻蓝蛋白复合物具有显著的保护酒精性肝损伤的增效。

关键词: 藻蓝蛋白; 酒精性肝损伤; 保护作用

中图分类号: R285; Q816

文献标识码: A

Protective Effect of Phycocyanin Compound on Alcohol-induced Liver Injury in Mice

SUO You-rui^{1*}, YANG Fang^{1,2}, WANG Hong-lun¹, LI Chun-ting^{1,2}

¹Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

²Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: The protective effect of phycocyanin compound on alcohol-induced liver injury in mice was studied. The mice were randomly divided into three groups according to their weight, the normal control group, diphenyl dibenzoate groups, phycocyanin groups. After feeding with phycocyanin compound for 42 d, the contents of ALT, AST in serum and the content of MDA, GSH-Px in liver were measured. The results showed that the phycocyanin compound could obviously control the contents of ALT, AST in serum, prevent the rise of MDA in liver and enhance the content of GSH-Px in liver. The pathological changes such as cell swell, grease denature, spot necrosis were few. The results indicated that phycocyanin compound has significant protective effect on the mouse liver injury induced by alcohol.

Key words: phycocyanin compound; liver injury induced by alcohol; protective effect

肝脏是人的重要代谢器官, 是多种化学物质代谢的主要场所, 引起肝损伤的原因有病毒性、化学性、创伤性等。其中化学性肝损伤的有害因素主要来源于: 医源性药物损伤, 酗酒和生产生活中接触的化学物质。近年来, 我国因各种化学性肝损伤导致的肝炎、肝硬化、肝癌等疾病患者大幅上升, 酒精中毒是肝硬化的主要病因^[1], 因此, 服用具有保护化学性肝损伤的保健食品, 对于解毒保肝和提高机体免疫能力具有重要的作用。

螺旋藻中含有多种小分子多糖及其它具有显著改善肝脏功能的多种活性成分, 其中以藻蓝蛋白为

主。它能够提高机体免疫力^[2], 促进血细胞再生, 可显著改善肝功能, 抑制化学性毒物对肝脏的损伤, 具有明显的保肝作用。白刺籽油中主要活性成分为不饱和脂肪酸, 其中以亚油酸的含量最高, 相对含量高达 70%, 有较为显著的提高机体免疫的功能, 保护化学性肝损伤的保健作用^[3]。

藻蓝蛋白复合物即以螺旋藻藻蓝蛋白和白刺籽油为主要原料的软胶囊制剂, 本文对其保护化学性肝损伤的增效学进行研究。

1 实验材料

1.1 实验样品

主要以藻蓝蛋白、白刺籽油为主要原料制成的软胶囊制剂, 装量为 750 mg/粒, 由本实验室研制, 委托青海明杏生物工程有限公司加工, 用前将内容

收稿日期: 2007-06-05

接受日期: 2007-11-30

基金项目: 中国科学院“西部之光”人才培养计划项目

*通讯作者 Tel: 86-971-6143857; E-mail: yrsuo@nwipb.ac.cn

物用吐温-80配成25%的乳剂进行动物灌胃。

1.2 实验动物

Wistar大白鼠由兰州医学院实验动物中心提供(动物合格证:医动字第14-006号)。

1.3 试剂与仪器

谷丙转氨酶(ALT),谷草转氨酶(AST),丙二醛(MDA),还原性谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒,由南京建成生物工程制品有限公司提供。肝匀浆介质:pH 7.4, 0.01 mol/L tris-HCl, 0.25 mol/L蔗糖。联苯双酯(江苏宜兴制药厂)。CARY300B D紫外可见分光光度计(美国VARIAN公司)。

2 实验方法

2.1 动物模型建立及实验方法

Wistar大鼠用56度红星二锅头白酒,乙醇含量为10.2 mol/L,剂量为15 mL/kg,即按1.5 mL/100 g每日早晨灌胃(ig)1次,连续灌胃42 d,建立酒精性肝损伤模型组。

设蒸馏水空白对照组,250 mg/kg联苯双酯阳性对照组,将藻蓝蛋白复合物按人体推荐剂量的5、10、20倍分为250、500、1000 mg/kg三个剂量组,共9个组,每组9只实验大鼠,体重(90.4 ± 11.3) g,雌雄各半。

酒精肝损伤模型组造模42 d,藻蓝蛋白复合物、阳性对照组连续灌胃给予42 d,空白对照组给予蒸馏水。末次给予受试物6 h后,动物断头取血。分离血清,测定ALT、AST、MDA、GSH;取肝脏加缓冲液在冰浴中匀浆,离心取上清液测定MDA、GSH;取肝脏标本石蜡包埋切片,H.E.染色,进行病理学检查,观察指标为肝细胞浊肿、脂肪变性和点状坏死。

2.2 指标检测方法

血清谷丙转氨酶(ALT):赖氏法。ALT作用于由丙氨酸及 酮戊二酸组成的底物,生成丙酮酸及谷氨酸,丙酮酸与2,4-二硝基苯胍作用,生成丙酮酸苯腙,在碱性溶液中呈棕红色,505 nm处比色。

血清谷草转氨酶(AST):赖氏法。AST作用于由天门氨酸及 酮戊二酸组成的底物,生成谷氨酸和草酰乙酸,草酰乙酸在反应过程中自行脱羧成丙酮酸,丙酮酸与2,4-二硝基苯胍,在碱性溶液中呈棕红色,505 nm处比色。

血清和肝匀浆中丙二醛(MDA):比色法。过氧化脂质降解产物丙二醛(MDA)与硫代巴比妥酸(TBA)缩合,形成红色产物,532 nm处比色。

血清和肝匀浆谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px):酶促法。GSH-Px可以促进过氧化氢(H₂O₂)与还原型谷胱甘肽(GSH)反应生成H₂O及氧化型谷胱甘肽(GSSG),GSH-Px的活力可用其酶促反应的速度来表示,测定此酶促反应中GSH的消耗,可求出酶的活力。GSH量的测定:GSH和二硫代二硝基苯甲酸作用生成5-硫代二硝基苯甲酸阴离子成较稳定的黄色,412 nm处测定。

2.3 数据统计处理

ALT、AST、MDA、GSH数据采用SPSS10.0统计软件进行单方差分析处理,表4采用卡方检验处理。

3 实验结果

藻蓝蛋白复合物对酒精性肝损伤大鼠血清ALT和AST的影响见表1。由表1可知,与空白对照组比较,酒精肝损伤模型组大鼠血清中ALT、AST的含量均显著升高。藻蓝蛋白复合物各剂量均能降低酒精性肝损伤大鼠血清中ALT、AST的含量,其中高、中剂量显著下降。表明藻蓝蛋白复合物可有效抑制酒精对肝细胞的损伤,具有良好的解酒保肝作用,剂量效应关系显著。

藻蓝蛋白复合物对酒精性肝损伤大鼠MDA水平的影响见表2。由表2可知,大鼠给予藻蓝蛋白复合物,其各剂量可显著抑制酒精引起的脂质过氧化反应,剂量效应关系明显,抑制血清和肝脏MDA的升高,保护肝细胞。

藻蓝蛋白复合物对酒精性肝损伤大鼠GSH的影响见表3。藻蓝蛋白复合物能有效抑制因长期给药1 藻蓝蛋白复合物对肝损伤大鼠血清ALT和AST的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 1 Effect of phycocyanin compound on serum ALT and AST in mice of liver injury($\bar{x} \pm s, n=9$)

| 组别 Group | 剂量 Dose (mg/kg · bw) | ALT (U/L) | AST (U/L) |
|-------------|-------------------------|-----------------|-----------------|
| 空白对照组 | 0 | 58.34 ± 2.48 | 82.41 ± 5.27 |
| 肝损伤组 | 0 | 83.24 ± 3.17 | 122.10 ± 8.49 |
| 联苯双酯组 | 250 | 63.74 ± 3.24 ** | 85.12 ± 6.31 ** |
| 低剂量组 | 250 | 75.24 ± 2.86 | 108.6 ± 11.43 |
| 中剂量组 | 500 | 69.23 ± 4.31 * | 92.43 ± 7.41 * |
| 高剂量组 | 1000 | 63.77 ± 2.89 ** | 88.23 ± 6.25 ** |

注:与空白对照组比较 $P < 0.01$; 与损伤模型组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: $P < 0.01$ vs normal control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs liver injury model group.

表 2 藻蓝蛋白复合物对肝损伤大鼠 MDA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 2 Effect of phycocyanin compound on MDA in mice of liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

| 组别 Group | 剂量 Dose (mg/kg · bw) | MDA | |
|-------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|
| | | 血清 (nmol/l) Serum | 肝匀浆 (nmol/l) Liver |
| 空白对照组 | 0 | 3.99 ±1.38 | 36.75 ±5.06 |
| 肝损伤组 | 0 | 8.09 ±1.2 | 67.28 ±13.24 |
| 联苯双酯组 | 250 | 5.31 ±2.06** | 48.84 ±8.37** |
| 低剂量组 | 250 | 5.56 ±2.31* | 58.24 ±10.21* |
| 中剂量组 | 500 | 5.77 ±2.04** | 54.74 ±8.16* |
| 高剂量组 | 1000 | 4.98 ±1.87** | 52.02 ±7.46** |

注:与空白对照组比较 $P < 0.01$; 与损伤模型组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: $P < 0.01$ vs normal control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs liver injury model group.

表 3 藻蓝蛋白复合物对肝损伤大鼠血清和肝匀浆中 GSH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 3 Effect of phycocyanin compound on GSH in the serum and liver of liver injury mice ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

| 组别 Group | 剂量 Dose (mg/kg · bw) | GSH | |
|-------------|-------------------------|--------------------|---------------------|
| | | 血清 (mg/L) Serum | 肝匀浆 (mg/L) Liver |
| 空白对照组 | 0 | 41.23 ±7.56 | 30.45 ±5.06 |
| 肝损伤组 | 0 | 14.27 ±5.11 | 9.38 ±3.68 |
| 联苯双酯组 | 250 | 35.17 ±4.89** | 26.44 ±10.34** |
| 低剂量组 | 250 | 24.37 ±7.22* | 21.76 ±4.86** |
| 中剂量组 | 500 | 28.71 ±8.34** | 25.62 ±7.41** |
| 高剂量组 | 1000 | 35.41 ±6.77** | 29.19 ±10.34** |

注:与空白对照组比较 $P < 0.01$; 与损伤模型组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: $P < 0.01$ vs normal control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs liver injury model group.

表 4 藻蓝蛋白复合物对肝损伤大鼠肝脏病理组织的影响 ($n = 9$)

Table 4 Effect of phycocyanin compound on the liver pathology organize of liver injury mice ($n = 9$)

| 组别 Group | 剂量 Dose (mg/kg · bw) | 细胞水肿 Cell swell | | | | 脂肪变性 grease denature | | | | 点状坏死 spot necrosis | | | |
|-------------|-------------------------|--------------------|---|----|----------------|-------------------------|---|----|----------------|-----------------------|---|----|----------------|
| | | - | + | ++ | +++ | - | + | ++ | +++ | - | + | ++ | +++ |
| 空白对照组 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 |
| 肝损伤组 | 0 | 0 | 2 | 2 | 5 ^a | 0 | 1 | 3 | 5 ^a | 0 | 2 | 3 | 4 ^a |
| 联苯双酯组 | 250 | 7 | 1 | 1 | 0 ^b | 6 | 2 | 1 | 0 ^b | 6 | 2 | 1 | 0 ^b |
| 低剂量组 | 250 | 7 | 1 | 1 | 0 ^b | 6 | 2 | 1 | 0 ^b | 6 | 2 | 1 | 0 ^b |
| 中剂量组 | 500 | 6 | 2 | 1 | 0 ^b | 7 | 1 | 1 | 0 ^b | 7 | 2 | 0 | 0 ^b |
| 高剂量组 | 1000 | 7 | 2 | 0 | 0 ^b | 8 | 1 | 0 | 0 ^b | 7 | 2 | 0 | 0 ^b |

注:与空白对照组比较 ^a $P < 0.01$; 与损伤模型组相比 ^b $P < 0.01$ 。Note: ^a $P < 0.01$ vs normal control group; ^b $P < 0.01$ vs liver injury model group.

予酒精而引起的 GSH 的消耗,可显著提高 GSH 的活性,也起到了保护肝细胞,降低其损害程度的作用,且剂量效应关系明显。

藻蓝蛋白复合物对酒精性肝损伤大鼠肝脏病理组织的影响见表 4。由表 4 可知,藻蓝蛋白复合物各剂量组对于防止肝脏细胞水肿,点状坏死,脂肪变性等异常现象有显著作用。

4 讨论与评价

酒精性肝损伤包括酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝纤维化及酒精性肝硬化,是指长期慢性酒精中毒引发的酒精性肝损伤。目前,它的发病机制并不十分清楚,自由基及其介导的脂质过氧化被认为是最主要的致病因素^[5]。乙醇在肝代谢时可产生大量自由基: O_2 、 H_2O_2 、OH、 C_2H_5O 和 C_2H_5OH 、

过量的自由基可引起肝细胞膜发生脂质过氧化反应,使细胞膜和细胞器结构破坏,膜流动性失常;大量肝内酶 (ALT、AST) 释放入血,并可使清除自由基酶 (SOD、GSH-Px) 进行性耗竭,肝细胞损伤进一步加重;肝功能异常、脂肪代谢紊乱、肝组织广泛脂肪样和空泡样变性,最终导致肝细胞广泛坏死、细胞肿胀死亡^[6],因此,清除自由基抑制脂质过氧化反应,保护肝细胞,恢复肝脏正常功能,是防治酒精性肝损伤相关病发生和发展的关键。

由本试验结果知:模型组大鼠给予酒精 42 d,其血清中的 ALT、AST、MDA 和肝脏中的 MDA 极显著地高于空白对照组;血清和肝脏中的 GSH 极显著地低于空白对照组;模型组肝脏切片组织学观察表明,长期给予酒精可使肝脏发生严重的细胞水肿、脂肪变性和点状坏死,与空白对照组相比具有极显著

差异,表明酒精性肝损伤模型成立。大鼠给予藻蓝蛋白复合物可有效地抑制酒精对肝细胞的损伤,与模型组比较,藻蓝蛋白复合物各组大鼠血清 ALT、AST下降,其中中、高剂量显著下降 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),并且量效关系显著,表明藻蓝蛋白复合物具有良好的解酒保肝作用。大鼠给予藻蓝蛋白复合物,各剂量可显著抑制酒精引起的脂质过氧化反应,抑制血清和肝脏 MDA 的升高,保护肝细胞,并且剂量效应关系显著。藻蓝蛋白复合物能够阻止因长期给予酒精而引起的 GSH 的消耗,可以显著提高 GSH 的活性,从而保护肝细胞,同时剂量效应关系明显。从表 4 可以看出藻蓝蛋白复合物解酒毒,抑制酒精对肝细胞的损伤,保护肝功能的作用,大鼠在给予酒精的同时,给予藻蓝蛋白复合物可有效地防治肝脏脂肪变性、点状坏死等组织的异常变化。

参考文献

- Hao HS (郝洪升), Li H (栗华). Risk factors of alcoholic liver injury. *Medical Recapitulate* (医学综述), 1998, 4: 26-27.
- Tang M (唐玫), Jin Y (金鹰), Guo BJ (郭宝江). Effect of phycocyanin from spirulina platensis on immune function in mice. *J Jinan Univ, Nat Sci Med* (暨南大学学报), 1998, 19 (5): 93-97.
- Suo YR (索有瑞), Gao H (高航), Wang HL (王洪伦). The protective effect of *Nitratia tangutensis* Bobr seed oil from Qaidam Basin on the liver injury of mice. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 17: 573-576.
- Yan XD (阎向东), Zheng S (郑珊), Xiong XY (熊晓燕). Compare analysis of CCl_4 and alcohol injured liver model in mice. *J Toxicology* (毒理学杂志), 2005, 19: 136-138.
- Rouach H, Fataccioli V, Gentil M, et al. Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology*, 1997, 25: 351.
- Walsh K, Alexander G. Alcoholic liver disease. *Postgrad Med J*, 2000, 76: 280.
- Hao HS (郝洪升), Li H (栗华). Risk factors of alcoholic liver injury. *Medical Recapitulate* (医学综述), 1998, 4: 26-27.
- Tang M (唐玫), Jin Y (金鹰), Guo BJ (郭宝江). Effect of phycocyanin from spirulina platensis on immune function in mice. *J Jinan Univ, Nat Sci Med* (暨南大学学报), 1998, 19 (5): 93-97.
- Suo YR (索有瑞), Gao H (高航), Wang HL (王洪伦). The protective effect of *Nitratia tangutensis* Bobr seed oil from Qaidam Basin on the liver injury of mice. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 17: 573-576.
- Yan XD (阎向东), Zheng S (郑珊), Xiong XY (熊晓燕). Compare analysis of CCl_4 and alcohol injured liver model in mice. *J Toxicology* (毒理学杂志), 2005, 19: 136-138.
- Rouach H, Fataccioli V, Gentil M, et al. Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology*, 1997, 25: 351.
- Walsh K, Alexander G. Alcoholic liver disease. *Postgrad Med J*, 2000, 76: 280.
- Suzuki H, Morita H, Iwasaki S, et al. New antimicrobial bicyclic peptides, celogentins D-H, and J, from the seeds of *Celosia argentea*. *Tetrahedron*, 2003, 59: 5307-5315.
- Morita H, Shimbo K, Shigemori H. Antimicrobial activity of moroidin, a bicyclic peptide from the seeds of *Celosia argentea*. *Bioorg Med Chem Letters*, 2000, 10: 469-471.
- Kobayashi J, Suzuki H, Shimbo K. Celogentins A-C, new antimicrobial bicyclic peptides from the seeds of *Celosia argentea*. *J Org Chem*, 2001, 66: 6626-6633.
- Lipkin A, Anisimova V, Nikonova A. An antimicrobial peptide ArAMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. *Phytochemistry*, 2005, 66: 2426-2431.
- Roy S, Sadhana P, et al. Purification, characterization and cloning of antiviral ribosome inactivating protein from *Amaranthus tricolor* leaves. *Phytochemistry*, 2006, 67: 1865-1873.
- Cai YZ, Sun M, Corke H. Identification and distribution of simple and acylated betacyanin pigments in the Amaranthaceae. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 1971-1978.
- Cai Y, Sun M, Corke H. Colorant properties and stability of *Amaranthus betacyanin* pigments. *J Agric Food Chem*, 1998, 46: 4491-4495.
- Schliemann W, Caib Y, Degenkolb T. Betalains of *Celosia argentea*. *Phytochemistry*, 2001, 58: 159-165.
- Cai YZ, Sun M, Corke H. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 2288-2294.
- He HP, et al. Extraction and purification of squalene from *Amaranthus* Grain. *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 368-372.
- Marccone MF, et al. Chemical characterization of *Achyranthes bidentata* seed. *Food Chemistry*, 2003, 81: 7-12.
- Chen XM, Tian GY. Structural elucidation and antitumor activity of a fructan from *Cyathula officinalis* Kuan. *Carbohydrate Research*, 2003, 338: 1235-1241.

(上接第 948 页)

- Suzuki H, Morita H, Iwasaki S, et al. New antimicrobial bicyclic peptides, celogentins D-H, and J, from the seeds of *Celosia argentea*. *Tetrahedron*, 2003, 59: 5307-5315.
- Morita H, Shimbo K, Shigemori H. Antimicrobial activity of moroidin, a bicyclic peptide from the seeds of *Celosia argentea*. *Bioorg Med Chem Letters*, 2000, 10: 469-471.
- Kobayashi J, Suzuki H, Shimbo K. Celogentins A-C, new antimicrobial bicyclic peptides from the seeds of *Celosia argentea*. *J Org Chem*, 2001, 66: 6626-6633.
- Lipkin A, Anisimova V, Nikonova A. An antimicrobial peptide ArAMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. *Phytochemistry*, 2005, 66: 2426-2431.
- Roy S, Sadhana P, et al. Purification, characterization and cloning of antiviral ribosome inactivating protein from *Amaranthus tricolor* leaves. *Phytochemistry*, 2006, 67: 1865-1873.
- Cai YZ, Sun M, Corke H. Identification and distribution of simple and acylated betacyanin pigments in the Amaranthaceae. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 1971-1978.
- Cai Y, Sun M, Corke H. Colorant properties and stability of *Amaranthus betacyanin* pigments. *J Agric Food Chem*, 1998, 46: 4491-4495.
- Schliemann W, Caib Y, Degenkolb T. Betalains of *Celosia argentea*. *Phytochemistry*, 2001, 58: 159-165.
- Cai YZ, Sun M, Corke H. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 2288-2294.
- He HP, et al. Extraction and purification of squalene from *Amaranthus* Grain. *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 368-372.
- Marccone MF, et al. Chemical characterization of *Achyranthes bidentata* seed. *Food Chemistry*, 2003, 81: 7-12.
- Chen XM, Tian GY. Structural elucidation and antitumor activity of a fructan from *Cyathula officinalis* Kuan. *Carbohydrate Research*, 2003, 338: 1235-1241.