

研究报告

番茄红素对小鼠酒精性肝损伤的拮抗作用

孙青¹,姜迎²,高源¹,赫军¹,吴海寰¹

(1. 济南军区总医院, 山东 济南 250031; 2. 山东省疾病预防控制中心食品与营养所, 山东 济南 250014)

摘要:目的 探讨番茄红素对持续酒精摄入所致的酒精性肝损伤的拮抗作用。方法 100只健康成年SPF级昆明雄性小鼠随机分为5组:对照组、模型组和低、中、高剂量番茄红素组,每组20只。低、中、高剂量番茄红素组小鼠经口灌胃浓度分别为0.33、0.67和2.00 g/L的番茄红素玉米油混悬液,对照组与模型组灌胃等体积的玉米油,容量为0.2 ml/10 g,1次/d,连续30 d。第31 d始,给予上述试剂3 h后,对照组灌胃等量蒸馏水,其余4组灌胃56°白酒0.12 ml/10 g;1次/d,连续8 d。末次灌胃、禁食16 h后,测定血清中甘油三酯(TG)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、蛋白质羰基,肝脏中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量,同时计算死亡率、累积存活时间。结果 与对照组比较,模型组血清中TG、ALT、AST、蛋白质羰基和肝脏中MDA含量增加,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,中、高剂量番茄红素组小鼠死亡率降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),存活时间延长;同时,肝脏中SOD、GSH-Px含量均高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.01$),而血清中TG、ALT、AST、蛋白质羰基和肝脏中MDA含量降低,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。随着番茄红素灌胃剂量升高,小鼠血清中TG、ALT、AST、蛋白质羰基和肝脏中MDA含量呈下降趋势,而SOD、GSH-Px含量呈上升趋势。结论 番茄红素对小鼠酒精性肝损伤具有一定的拮抗作用。

关键词:番茄红素;酒精;酒精性肝损伤;毒理学;护肝;拮抗作用;生物活性

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2017)02-0145-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2017.02.006

The antagonizing effect of lycopene on alcohol-induced liver injury in mice

SUN Qing¹, JIANG Ying², GAO Yuan¹, HE Jun¹, WU Hai-huan¹

(1. Jinan Military General Hospital, Shandong Jinan 250031, China; 2. Institute of Food and Nutrition, Shandong Center for Disease Control and Prevention, Shandong Jinan 250014, China)

Abstract: Objective To research the antagonizing effect of lycopene on alcohol-induced liver injury due to continuous ethanol intake in mice. **Methods** A total of 100 healthy adult of SPF male Kunming mice were randomly divided into 5 groups, including the control group, the model group, and the low, middle and high dose lycopene groups with different doses (0.33, 0.67, 2.00 g/L) of lycopene respectively by oral gavage at 0.2 ml/10 g once a day for 30 days, and the control group and model group were given corn oil. From the 31st day, 3 hours after administration, the control group was given distilled water, while the other 4 groups were given 56 degrees liquor by oral gavage at 0.12 ml/10 g once a day for 8 days. After the last administration, 5 groups were fasted for 16 h, then triglyceride (TG), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), protein carbonyl content in blood serum, and malonaldehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) in live were tested, and mortality and cumulative survival time were calculated. **Results** Compared with the control group, the TG, ALT, AST, protein carbonyl and MDA level of the model group increased significantly ($P < 0.01$). Compared with the model group, the mortality of middle and high dose groups was significantly reduced ($P < 0.05$), and the cumulative survival time was extend. The SOD and GSH-Px levels were significantly higher ($P < 0.01$), while the TG, ALT, AST, MDA and protein carbonyl content were obviously reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). With the increasing lycopene doses, the TG, ALT, AST, MDA and protein carbonyl content were dropped, while the SOD and GSH-Px levels were on the rise. **Conclusion** Lycopene had a certain antagonizing effect on alcohol-induced liver injury in mice.

Key words: Lycopene; alcohol; alcoholic-induced liver injury; toxicology; liver protection; antagonism; biological activity

收稿日期:2016-12-27

作者简介:孙青 女 医师 研究方向为临床营养 E-mail:cyansq@163.com

通信作者:吴海寰 女 副主任医师 研究方向为运动营养和临床营养 E-mail:wuhaihuan@163.com

番茄红素(lycopene)是天然存在于番茄、西瓜、柑橘、茺菁等果蔬中的一种类胡萝卜素,属于脂溶性直链型不饱和碳氢化合物^[1]。近年来,番茄红素的多种生物活性研究愈来愈深入,包括抗氧化、抑制肿瘤、保护心肌细胞等^[2],本课题组前期也在其拮抗单次灌胃过量乙醇诱导的小鼠脂质过氧化损伤方面得出了肯定结论^[3]。我国是酒产品消费大国,酒精滥用和持续酒精依赖导致的酒精性肝损伤与同期肝病住院病例的构成比呈逐年上升趋势^[4]。酒精性肝损伤已成为现代社会严重的公共卫生问题,本试验研究番茄红素对持续酒精摄入引起肝损伤的保护作用,为预防酒精性肝损伤和开发解酒护肝产品寻找方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

健康成年 SPF 级昆明雄性小鼠 100 只,体质量 25 ~ 30 g,由山东大学实验动物中心提供[合格证号:SCXK(鲁)20090001]并饲养(实验动物环境设施合格证号:鲁动环字 20100011 号)。实验室温度(22 ± 2)℃,相对湿度(50 ± 5)%;小鼠自由摄食、饮水。

1.1.2 主要仪器与试剂

DY89-II 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司)、M200 pro 酶标仪(瑞士 Tecan)、LDZ5-2 型低速自动平衡离心机。

番茄红素(纯度 90%,济南市果品研究院),白酒(56°,北京酿酒总厂)。甘油三酯(TG)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、丙二醛(MDA)、蛋白质羰基、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 混悬液制备

番茄红素玉米油混悬液配制:准确量取适量的番茄红素原液溶解于玉米油中,配制成相应浓度的番茄红素玉米油混悬液,置于棕色细口瓶中;3 d 配置一次,冷藏于冰箱以防止氧化。

1.2.2 动物分组与染毒方法

以正常饲料适应性喂养 3 d 后,将小鼠按体质量随机分为对照组、模型组和低、中、高剂量番茄红素组,每组 20 只。低、中、高剂量番茄红素组经口灌胃浓度分别为 0.33、0.67 和 2.00 g/L 番茄红素玉米油混悬液,对照组给予等体积的玉米油;容量为 0.2 ml/10 g,1 次/d,连续 30 d。第 31 d 始,在给予

上述试剂 3 h 后,对照组灌胃等容蒸馏水,其余 4 组灌胃 56°白酒 0.12 ml/10 g;1 次/d,连续 8 d^[5]。

1.2.3 标本的采集

末次灌胃、禁食 16 h 后,摘眼球取血,以 3 500 r/min 离心 8 min 分离血清待测。处死小鼠、取出肝脏后,以冰冷生理盐水反复漂洗两次,并用滤纸吸干;精确称取 0.20 g 肝组织,加入 3.8 ml 生理盐水,用玻璃匀浆机以 2 000 r/min 匀浆 10 s,间歇 30 s,重复 3 次,制成 5% 的肝组织匀浆;并于 4℃ 3 500 r/min 离心 10 min 后,取适量上清液待测。

1.2.4 指标的测定

采用相关试剂盒测定血清 TG、ALT、AST、蛋白质羰基及肝匀浆中 MDA、SOD 和 GSH-Px 含量;肝匀浆中微量血红蛋白含量测定采用比色法。

根据试验期内各组小鼠死亡数,计算死亡率(死亡率 = 试验期末死亡小鼠数/开始白酒灌胃时小鼠数 × 100%)及累积存活时间(各组每只小鼠白酒灌胃后存活天数之和)。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,试验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 进行表示。两独立样本间比较采用独立样本的 *t* 检验;死亡率的比较采用 2 × 2 卡方检验;多组间比较采用方差齐性检验和单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本情况

白酒灌胃后,模型组小鼠首先有活动增加的兴奋表现,但很快便行走不稳;约 0.5 h 后出现被动姿势的晕睡醉倒状态,并能持续数小时。3 d 后,小鼠兴奋状态逐渐减弱,出现溏便、精神萎靡、摄食减少等现象。8 d 后,小鼠普遍状态不佳,活动减少、酣睡时间延长。番茄红素组小鼠出现上述现象和程度相对减少,醉酒后恢复所需时间相对较少。试验期内,除对照组外,各组小鼠皆有死亡。模型组和低、中、高剂量番茄红素组分别有 8、6、3、2 只小鼠死亡,其死亡率依次为 40% (8/20)、30% (6/20)、15% (3/20)、10% (2/20),累积存活时间分别为 121、133、153、156 d。与模型组比较,高剂量组小鼠死亡率降低,差异有统计学意义($\chi^2 = 4.800, P < 0.05$),并能延长小鼠的存活时间。

2.2 小鼠酒精性肝损伤模型的建立

经 *t* 检验分析,模型组小鼠经持续性酒精灌胃后,血清中 ALT($t = -33.357, P < 0.01$)、AST($t = -21.656, P < 0.01$)、TG($t = -3.918, P < 0.01$)、蛋

白质羰基($t = -3.643, P < 0.01$)及肝脏中MDA含量($t = -6.896, P < 0.01$)均高于对照组,差异有统

计学意义($P < 0.05$),酒精性肝损伤小鼠模型诱导成功^[5],具体结果见表1。

表1 番茄红素对小鼠血清中肝转移酶及过氧化脂质的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of lycopene on hepatic transferase and lipid peroxide in serum of mice

组别	动物数	ALT /(U/L)	AST /(U/L)	TG /(mmol/L)	MDA /(nmol/mg prot)	蛋白质羰基 /(U/mg prot)
对照组	20	27.06 ± 5.82	77.58 ± 14.55	1.23 ± 0.48	1.98 ± 0.53	2.96 ± 0.65
模型组	12	144.37 ± 13.95 ^a	190.05 ± 13.65 ^a	1.91 ± 0.46 ^c	3.63 ± 0.84 ^c	3.99 ± 0.95 ^c
低剂量组	14	117.77 ± 11.70 ^b	170.19 ± 14.68 ^b	1.82 ± 0.47	3.22 ± 0.65	3.71 ± 0.51
中剂量组	17	73.06 ± 11.82 ^b	127.03 ± 17.02 ^b	1.54 ± 0.45 ^a	2.64 ± 0.71 ^b	3.38 ± 0.79 ^a
高剂量组	18	37.66 ± 12.15 ^b	96.39 ± 13.50 ^b	1.29 ± 0.40 ^b	2.18 ± 0.64 ^b	2.98 ± 0.51 ^b

注:a为与模型组比较, $P < 0.05$;b为与模型组比较, $P < 0.01$;c为与对照组比较, $P < 0.01$ 。

2.3 小鼠肝脏中抗氧化酶含量的测定结果

由表2可见,经口灌胃小鼠不同剂量番茄红素38 d后,中、高剂量组肝脏中SOD、GSH-Px含量均高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。随着番茄红素剂量的升高,肝脏中SOD、GSH-Px含量均呈上升趋势。

表2 番茄红素对小鼠肝脏中抗氧化酶含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of lycopene on antioxidant enzyme contents

		in mouse liver	
组别	动物数	SOD /(U/mg prot)	GSH-Px /(U/mg prot)
对照组	20	935.61 ± 98.15	142.81 ± 23.66
模型组	12	729.46 ± 70.13	91.76 ± 16.74
低剂量组	14	793.81 ± 112.63	103.63 ± 16.53
中剂量组	17	883.59 ± 99.94 ^b	120.52 ± 18.44 ^b
高剂量组	18	956.38 ± 89.91 ^b	146.02 ± 17.34 ^b

注:b为与模型组比较, $P < 0.01$ 。

2.4 小鼠血清中肝转移酶及过氧化脂质含量测定结果

由表1可见,与模型组比较,中、高剂量番茄红素组小鼠血清中ALT、AST、TG、蛋白质羰基及肝脏中MDA含量降低,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);随着番茄红素剂量升高,呈减少趋势。

3 讨论

酒精性肝损伤是由于长期大量饮酒(饮酒史超过5年,折合乙醇量男性 ≥ 40 g/d,女性 ≥ 20 g/d)^[6]导致的中毒性肝损伤,初期通常表现为脂肪肝,进而可发展成酒精性肝炎、肝纤维化和肝硬化。关于酒精性肝损伤的发病机制,目前广为接受的是DAY等^[7]提出的“二次打击”学说,即酒精及其代谢产物对肝细胞的直接影响可作为“初次打击”,而其所致肝细胞功能异常、脂质过氧化、线粒体功能异常等成为“再次打击”,最终诱发肝硬化。

进入血液循环的酒精,约90%在肝脏内经乙醇脱氢酶及过氧化物酶等作用转化为乙醛。乙醛具有很强的毒性,可致酶失活并影响DNA修复^[8],且明显影响肝脏对氧的利用。同时,乙醇代谢时产生

的大量自由基可诱导肝细胞膜生成脂质过氧化产物,如MDA、蛋白质羰基等^[9]。此外,乙醇的氧化使肝细胞质中氧化型辅酶I(NAD)减少,而还原型辅酶I(NADH)增多,NAD/NADH比例降低,三羧酸循环受到抑制,TG的分解减少而合成增加,从而使血清和肝脏中的TG含量增加^[10]。ALT、AST主要分布于肝细胞内,正常血清中可检出的含量很少;当肝细胞遭到破坏而破裂时,ALT、AST会大量释放入血液,故血清中ALT、AST被认为是肝损伤的敏感指标^[11]。在本研究中,小鼠持续酒精灌胃后,与对照组比较,模型组脂质过氧化程度及肝转移酶含量的增加均差异有统计学意义($P < 0.01$)。按照保健食品检验与评价技术规范(2003)^[5],酒精性肝损伤小鼠模型成立,这与BEIER等^[12]的研究结论相一致;反之,与模型组比较,中、高剂量番茄红素组小鼠死亡率降低,存活时间延长,而血清中TG、ALT、AST、蛋白质羰基及肝脏中MDA含量降低,均差异有统计学意义($P < 0.05$),因而判定番茄红素可对机体产生保护作用。

番茄红素作为一种天然的抗氧化剂,具有比其他类胡萝卜素更强的淬灭单线态氧的能力,其淬灭常数 K_q 可达到 $31 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (β -胡萝卜素为 $13 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),接近于扩散控制。自由基在与细胞膜上的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应时,可生成如脂质过氧基等具有毒性的代谢产物;其中对机体危害最大且最具代表性的是MDA,其与活性氧自由基的多少及脂质过氧化程度呈正相关^[13]。RAO等^[14]研究发现,番茄红素可有效抑制脂类、蛋白质和DNA的氧化,使血清中与硫代巴比妥酸反应的脂质过氧化物(如MDA等)明显减少。GSH-Px作为一种含硒抗氧化酶,可特异性地将自由基和过氧化物还原成对机体无损害的水和羟基化物,其活性的高低直接反映机体的抗氧化能力^[15]。SOD是超氧阴离子自由基的清除剂,其活性的大小直接反映机体中自由基的数量^[16];它能抑制黄嘌呤脱氢酶转化为黄嘌呤氧化酶,延缓对肝细胞的损伤。

GSH-Px 和 SOD 共同构成消除自由基的酶系防御体系,可有效且特异地清除活性氧自由基,从而发挥阻止脂质过氧化物的作用^[17]。因此,通过检测组织中 GSH-Px 和 SOD 的含量可以评价番茄红素是否具有对酒精性肝损伤的拮抗作用。本试验结果与 BREINHOLT 等^[18]的研究结果较为一致,番茄红素提高了肝匀浆中 GSH-Px 及 SOD 含量,降低了血清 TG 水平及肝脏中 MDA 等过氧化物的产生,从而拮抗长期大量饮酒所带来的机体损伤。

番茄红素的分子结构中含有大量的不饱和双键,这可能是其具有猝灭自由基作用的原因所在。在人体中,番茄红素大量蓄积于肝脏、血液、肾上腺、睾丸等器官,并可透过血脑屏障进入大脑组织^[19]。大量的流行病学试验和实验室观察资料也证实了番茄红素在预防人类疾病上的作用,本研究的结果可为酒精性肝损伤的预防和治疗提供新的靶点。

参考文献

- [1] 闫新焕,宋焯,刘雪梅,等. 番茄红素研究进展及应用[J]. 中国果蔬,2013,12(12):25-28.
- [2] 董艳,孙青,姜迎,等. 番茄红素对溴代苯诱导小鼠脂质过氧化损伤的拮抗作用[J]. 环境与健康杂志,2012,29(6):514-516.
- [3] 刘娜,江红梅,孙青,等. 番茄红素对乙醇诱导小鼠脂质过氧化损伤的保护作用[J]. 营养学报,2014,36(5):491-493.
- [4] 全国酒精性肝损伤调查协作组. 全国酒精性肝病的多中心调查分析[J]. 中华消化杂志,2007,27(4):231-234.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[Z]. 2003.
- [6] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝损伤学组. 酒精性肝病诊疗指南(2010年修订版)[J]. 中华肝病杂志,2010,18(3):167-169.
- [7] DAY C P, JAMES O F. Steatohepatitis: a tale of two "hit"? [J]. Gastroenterology, 1998, 114(4):842-845.
- [8] DAS S K, VASUDEVAN D M. Alcohol-induced oxidative stress [J]. Life Sci, 2007, 81(3):177-187.
- [9] 邱萍,李相,孔德松,等. 酒精性肝病发病机制研究的新进展[J]. 中国药理学通报,2014,30(2):160-163.
- [10] 张利军,师建国,陈广生,等. 乙醇对小鼠原代肝细胞脂肪酸氧化速度的影响[J]. 中华医学实践杂志,2007,6(1):1-3.
- [11] 黄健,欧昌荣,王求娟,等. 牡蛎预防醉酒及对小鼠酒精性肝损伤保护的研究[J]. 中国食品学报,2012,12(10):29-33.
- [12] BEIER J I, MCCLAIN C J. Mechanisms and cell signaling in alcoholic liver disease [J]. Biol Chem, 2010, 391(11):1249-1264.
- [13] CHOUDHARI S M, ANANTHANARAYAN L. Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues [J]. Food Chemistry, 2007, 102(1):77-81.
- [14] RAO A V, AGARWAL S. Bioavailability and in vivo antioxidant properties of lycopene from tomato products and their possible role in the prevention of cancer [J]. Nutr Cancer, 1998, 31(3):199-203.
- [15] HABDOUS M, HERBERTH B, VINCENT-VIRY M, et al. Serum total antioxidant status, erythrocyte superoxide dismutase and whole blood glutathione peroxidase activities in the Stanislas cohort: influencing factors and reference intervals [J]. Clin Chem Lab Med, 2003, 41(2):209-215.
- [16] METIN G, ATUKEREN P, AHURFAN A A, et al. Lipid peroxidation, erythrocyte superoxide-dismutase activity and trace metals [J]. Journal of Epidemiology, 2002, 12(1):14-21.
- [17] GIARDINO R, GIAVARESI G, FINI M, et al. The role of different chemical modifications of superoxide dismutase in preventing a prolonged muscular ischemia/reperfusion injury [J]. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 2002, 30(3):189-190.
- [18] BREINHOLT V, LAURIDSEN S T, DANESHVAR B, et al. Dose-response effects of lycopene on selected drug-metabolizing and antioxidant enzymes in the rat [J]. Cancer Lett, 2000, 154(2):201-210.
- [19] KAUR H, CHAUHAN S, SANDHIR R, et al. Protective effect of lycopene on oxidative stress and cognitive decline in rotenone induced model of Parkinson's disease [J]. Neurochem Res, 2011, 36(8):1435-1443.

· 资讯 ·

欧盟制定甜菊糖苷在糖果中的使用限量

2017年2月27日,欧盟发布法规(EU)2017/335,就甜菊糖苷(E 960)作为甜味剂在低能量糖果中的使用,修订欧洲议会和理事会条例(EC)No 1333/2008 附录 II。甜菊糖苷在无糖糖果、硬糖、软糖、甘草糖、牛乳糖、杏仁糖中的使用限量为 350 mg/kg;在强香型喉糖中的使用限量为 670 mg/kg;在口气清新微糖果中的使用限量为 2 000 mg/kg。

(来源食品伙伴网,相关链接:<http://www.foodmate.net/law/europa/190305.html>)