

葡萄籽原花青素对CCl₄诱导小鼠氧化性肝损伤的保护作用及其机制研究[△]

李小丽^{1*},王楷扬²,胡建辉³,李斌¹,蔡永青^{4#}(1.第三军医大学药学院药理学教研室,重庆 400038;2.第三军医大学药学院学员十八营,重庆 400038;3.第二军医大学学员旅学员十队,上海 200433;4.第三军医大学第三附属医院药剂科,重庆 400042)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)13-1752-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.13.07

摘要 目的:研究葡萄籽原花青素(GSPE)对小鼠氧化性肝损伤的保护作用及其机制。方法:将24只小鼠随机分为正常组(生理盐水)、模型组(生理盐水)和GSPE低、高剂量组(100、200 mg/kg),连续ig给药4 d,每天1次。末次给药后,除正常组外其余各组小鼠ip含0.2%四氯化碳(CCl₄)的植物油溶液复制小鼠肝损伤模型,造模完成后各组小鼠继续ig给药3 d。观察GSPE对急性肝损伤小鼠肝脏大体、病理和肝脏系数的影响;检测血清中丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)活性;检测肝组织中凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax和自噬相关蛋白p62的表达;检测肝组织中增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白的表达。结果:与正常组比较,模型组小鼠肝脏系数及血清中ALT、AST活性升高;小鼠肝组织全部出现病变(多集中于Ⅲ级);肝组织中Bcl-2、p62蛋白表达减弱,Bax蛋白表达增强,Bcl-2/Bax比值降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),PCNA蛋白表达减弱。与模型组比较,GSPE低、高剂量组小鼠肝脏体积明显缩小,肝细胞坏死和炎症细胞浸润明显减少,病变程度减轻(多集中于Ⅰ、Ⅱ级),肝脏系数明显降低;血清中ALT、AST活性降低;肝组织中Bcl-2、p62蛋白表达增强,Bax蛋白表达减弱,Bcl-2/Bax比值明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),PCNA蛋白表达增强。结论:GSPE对CCl₄诱导的小鼠氧化性肝损伤具有一定保护作用;其机制可能与GSPE促进小鼠肝细胞增殖、抑制肝组织细胞凋亡和自噬作用有关。

关键词 葡萄籽原花青素;急性肝损伤;凋亡;自噬;增殖;小鼠

Study on Protective Effect of Grape Seed Proanthocyanidins against Acute Liver Injury Induced by CCl₄ in Mice and Its Mechanism

LI Xiaoli¹, WANG Kaiyang², HU Jianhui³, LI Bin¹, CAI Yongqing⁴(1. Pharmacology Teaching and Research Section, Dept. of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Student Eighteenth Camp, Dept. of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 3. Student Brigade Tenth Team, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 4. Dept. of Pharmacy, the Third Affiliated Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study protective effect of grape seed proanthocyanidins (GSPE) against acute liver injury in mice and its mechanism. **METHODS:** 24 mice were randomly divided into normal group (normal saline), model group (normal saline), GSPE low-dose and high-dose groups (100, 200 mg/kg). They were given relevant medicine intragastrically for consecutive 4 days, once a day. After the last administration, those groups were given vegetable oil solution containing 0.2% CCl₄ intraperitoneally to induce liver injury model except normal group; after modeling, those groups continued intragastric administration of medicine for 3 d. The effects of GSPE on liver appearance, pathological and liver coefficient in mice with acute liver injury were observed; the activity of ALT and AST were detected in serum; the expression of apoptosis-related protein Bcl-2 and Bax, that of autophagy-related protein p62 were detected in liver tissue; the expression of PCNA protein in liver tissue was determined. **RESULTS:** Compared with normal group, liver coefficient, the activity of ALT and AST in serum increased in model group; mice liver tissue pathological changes mostly concentrated in the grade Ⅲ; the expression of Bcl-2 and p62 protein were significantly lowered in liver tissue, while Bax expression was increased, the Bcl-2/Bax was decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), the expression of PCNA protein was decreased in liver tissue. Compared with model group, liver volume, necrosis of liver cells and inflammatory cell infiltration decreased significantly, and lesion degree (concentrated in the grade Ⅰ and Ⅱ) and liver coefficient decreased; the activity of ALT and AST in serum decreased; the expression of Bcl-2, p62 and Bcl-2/Bax increased, while protein expression of

本栏目协办

北京安妮福克斯信息咨询有限公司

地址:北京市东城区建国门内大街7号光华长安大厦1座301
电话:4000008137 邮编:100005

△基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81302797);第三军医大学第一附属医院青年人才创新基金(No.SWH2014QN07)

*讲师,硕士。研究方向:抗免疫药理学。E-mail:plum181181@126.com

#通信作者:主管药师,硕士。研究方向:抗炎药物中自噬的作用机制。电话:023-68757099。E-mail:cy0721@163.com

Bax decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), the expression of PCNA protein increased in liver tissue. CONCLUSIONS: GSPE exerts a protective effect on CCl_4 induced oxidative liver injury in mice, and its mechanism may be related to promoting the proliferation of liver cell, inhibiting the apoptosis and autophagy of liver cells.

KEYWORDS Proanthocyanidins; Acute liver injury; Apoptosis; Autophagy; Proliferation; Mice

病毒性肝炎、酒精性肝病、非酒精性脂肪肝、药物性肝病等肝脏疾病是全球性的公共健康问题,具有发病率高、病程长、难以彻底治愈、病情反复发作的特点^[1]。肝病的对症药物治疗是临床上的常用手段。天然药物因具有分布广泛、资源丰富等特点,常被用作筛选药物的主要来源^[2]。

葡萄籽原花青素(GSPE)是从葡萄籽中提取的一类多酚类化合物,由不同数量的儿茶素或表儿茶素缩合而成。其药理作用广泛,具有较强的抗氧化、抗炎、清除氧自由基能力等药理作用。据文献报道,GSPE对乙醇、溴苯以及四氯化碳(CCl_4)诱导的肝损伤模型动物均具有保护作用,但具体的作用机制尚不清楚^[3-6]。故本研究拟采用 CCl_4 诱导的小鼠氧化性肝损伤为模型^[3],深入研究GSPE对氧化性肝损伤的保护作用及其机制。

1 材料

1.1 仪器

Vortex Genius漩涡震荡仪(德国IKA公司);AE 163电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司);HH-S4恒温水浴锅(上海启前电子科技有限公司);Milli-Q Gradient A10超纯水器(美国Millipore公司);IX51倒置显微镜(日本Olympus公司);TDL-5A离心机(上海菲格尔分析仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

葡萄籽原花青素(天津尖峰天然产物有限公司,批号:1201012-31,纯度: $>98\%$); CCl_4 (成都科龙化工试剂厂,批号:120620,分析纯);p62、LC3、Bcl-2兔源单克隆抗体(美国CST公司,批号:7695s、3868s、15071s);增殖细胞核抗原(PCNA)、Bax兔源单克隆抗体(上海生物工程有限公司,批号:D120014、D120017);HRP标记羊抗兔IgG(北京中杉生物技术有限公司);谷氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:C009-2、C010-2);Western及IP细胞裂解液(碧云天生物技术有限公司)。

1.3 动物

清洁级昆明种小鼠,24只,♂♀各半,体质量18~22 g,购于第三军医大学实验动物研究中心,许可证号为SCXK-(军)2007015。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将小鼠按体质量随机分为4组,每组6只,分别为正常组、模型组和GSPE低、高剂量组(100、200 mg/kg)(剂量设置根据前期预实验结果及相关参考文献^[3-6])。各组小鼠ig相应药物,正常组和模型组小鼠ig生理盐水(0.2 ml/10 g),每天1次,连续4 d。给药完成后模型组及GSPE低、高剂量组小鼠ip含0.2% CCl_4 的植物油溶液(0.1 ml/10 g)复制小鼠急性肝损伤模型,正常组小鼠ip不含 CCl_4 的植物油(0.1 ml/10 g)。造模完成后各组小鼠继续ig相应药物3 d(给药剂量同前)。

2.2 标本的采集及处理

给药结束后各组小鼠禁食不禁水24 h,经眼球取血,以离心半径为9 cm、3 000 r/min离心10 min,分离血清, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存。采用酶联免疫吸附法,按试剂盒说明书要求检测血清中ALT、AST活性。取血后颈椎脱臼处死小鼠,取出肝脏,用冷生理盐水冲洗,用滤纸拭干后进行肝脏大体观察并拍

照。称定肝脏质量,计算肝脏系数:肝脏系数=肝脏湿质量(g)/小鼠体质量(g) $\times 100\%$ 。取部分肝组织用4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,用于苏木精-伊红(HE)染色制备病理切片;免疫组化法检测肝组织中PCNA蛋白的表达。取部分肝组织加入液氮研磨后,按Western及IP细胞裂解液说明书抽提蛋白,采用Western blot法检测相关蛋白的表达。

2.3 HE染色观察肝组织病理变化

小鼠肝组织常规HE染色后,在倒置显微镜下观察肝组织病变^[3]:0级,无病变;Ⅰ级,肝细胞疏松肿胀、有点坏死,可见少量炎性细胞浸润;Ⅱ级,肝细胞空泡坏死和灶性坏死,可见多个炎性细胞浸润;Ⅲ级,广泛细胞空泡坏死和灶性坏死,肝小叶内炎性细胞浸润明显。

2.4 Western blot法检测肝组织中凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax和自噬相关蛋白p62的表达

将肝组织用液氮研磨后,加入Western及IP细胞裂解液抽提蛋白,采用二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度。取40 μg 蛋白上样,采用10%的分离胶行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,3 h后湿法转膜,加入5%脱脂奶粉封闭2 h;取出膜,分别加入按1:1 000稀释的兔源一抗,4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜,PBST洗膜后加入分别按1:10 000稀释的羊抗兔IgG二抗,化学发光法显影。采用ChemiDoc XRS凝胶成像系统进行信号扫描,测定条带灰度值,采用Quantity One软件进行定量分析,以目的基因与内参 β -actin灰度比值表示目的基因的相对表达水平。

2.5 免疫组化法(SP法)检测肝组织中PCNA蛋白的表达

取部分肝组织固定于4%多聚甲醛中,石蜡包埋,常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水;过氧化氢(H_2O_2)封闭内源性过氧化物酶,抗原修复,正常羊血清工作液封闭,37 $^\circ\text{C}$ 孵育10 min,滴加1:100稀释的PCNA一抗,4 $^\circ\text{C}$ 冰箱孵育过夜;磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后滴加生物素标记二抗,37 $^\circ\text{C}$ 孵育30 min,PBS冲洗,DAB/ H_2O_2 反应染色;自来水充分冲洗后,苏木精复染,常规脱水、透明、干燥、封片。采用OLYMPUS51显微镜拍照,观察PCNA蛋白表达情况,PCNA阳性呈棕黄色颗粒状,主要表达于胞核,极少数表达于胞浆。

2.6 统计学处理

采用SPSS 16.0统计学软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,若方差齐性则采用 t 检验分析,若方差不齐性则采用Games-Howell分析;等级资料的分析采用Kruskal-wallis秩和检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 肝脏大体观察结果

正常组小鼠肝脏体积正常,表面光滑质软,肝组织红润、呈红褐色;模型组小鼠肝脏体积明显增大,表面粗糙,有较多灰白色小结;GSPE低、高剂量组小鼠肝脏与模型组比较,体积明显减小,肝组织红润、灰白色小结减少。

3.2 肝组织病理观察结果

正常组小鼠肝细胞形态正常,肝小叶规则,中央静脉周围肝细胞索呈放射状排列;模型组小鼠肝细胞排列混乱,肝小叶不完整,肝细胞明显肿胀、胞质疏松,可见明显的点灶状坏死,

炎症细胞浸润明显,小鼠肝组织全部出现病变,多集中于Ⅲ级病变;与模型组比较,GSPE低、高剂量小鼠肝小叶较完整,肝细胞坏死和炎症细胞浸润明显减少,病理形态得到改善,多集中于Ⅰ级或Ⅱ级病变。各组小鼠肝组织病变分级统计结果见表1、病理图片见图1。

表1 各组小鼠肝组织病变分级统计结果(例)
Tab 1 Pathological lesion degree of liver tissue of mice in each group(case)

组别	肝组织病变分级			
	0级	Ⅰ级	Ⅱ级	Ⅲ级
正常组	6	0	0	0
模型组	0	0	1	5
GSPE低剂量组	1	2	3	0
GSPE高剂量组	1	3	2	0

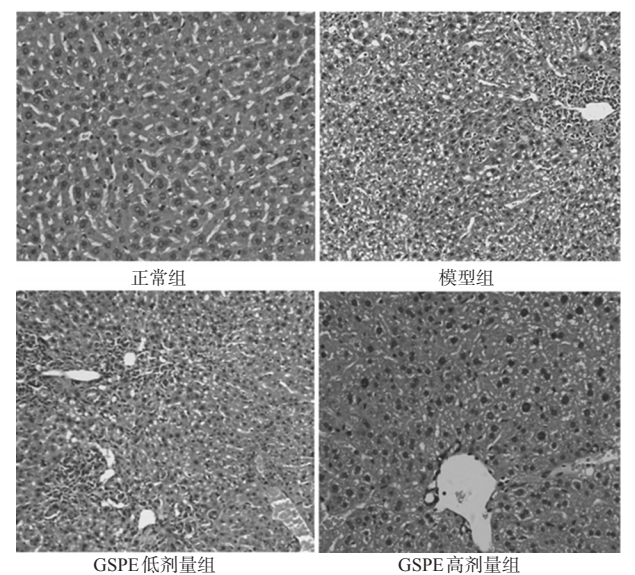


图1 各组小鼠肝组织病理观察结果(×400)
Fig 1 Pathological observation of liver tissue of mice in each group(×400)

3.3 肝脏系数检测结果

与正常组比较,模型组小鼠肝脏系数明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,GSPE低、高剂量组小鼠的肝脏系数明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。各组小鼠肝脏系数检测结果见表2。

表2 各组小鼠肝脏系数检测结果($\bar{x} \pm s, n=6$)
Tab 2 Liver index of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	小鼠体质量,g	肝脏湿质量,g	肝脏系数,%
正常组	25.93 ± 0.87	1.15 ± 0.08	4.42 ± 0.33
模型组	19.13 ± 1.41	1.89 ± 0.12	9.93 ± 1.23*
GSPE低剂量组	22.55 ± 1.33	1.46 ± 0.10	6.47 ± 0.43 [#]
GSPE高剂量组	23.80 ± 1.25	1.31 ± 0.10	5.52 ± 0.35 ^{##}

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$
Note: vs. normal group,* $P<0.01$; vs. model group,[#] $P<0.01$

3.4 血清中ALT和AST活性检测结果

与正常组比较,模型组小鼠血清中ALT、AST活性升高($P<0.01$);与模型组比较,GSPE低、高剂量组小鼠血清中ALT、AST活性显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组小鼠血清中ALT、AST活性检测结果见表3。

3.5 肝组织中Bcl-2、Bax蛋白表达检测结果

表3 各组小鼠血清中ALT、AST活性检测结果($\bar{x} \pm s, n=6, U/L$)

Tab 3 The activity of ALT and AST in serum of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=6, U/L$)

组别	ALT	AST
正常组	18.03 ± 5.35	31.95 ± 3.86
模型组	158.08 ± 26.15*	103.02 ± 14.27*
GSPE低剂量组	92.96 ± 16.34 ^{##}	73.11 ± 15.76 [#]
GSPE高剂量组	67.02 ± 11.54 ^{##}	66.05 ± 9.59 ^{##}

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$
Note: vs. normal group,* $P<0.01$; vs. model group,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

与正常组比较,模型组小鼠肝组织中Bcl-2蛋白表达明显下调、Bax蛋白表达明显上调,Bcl-2/Bax比值降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,GSPE低、高剂量组小鼠肝组织中Bcl-2蛋白表达明显上调、Bax表达明显下调,Bcl-2/Bax比值升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组小鼠肝组织中Bcl-2、Bax蛋白表达电泳图见图2、测定结果见表4。

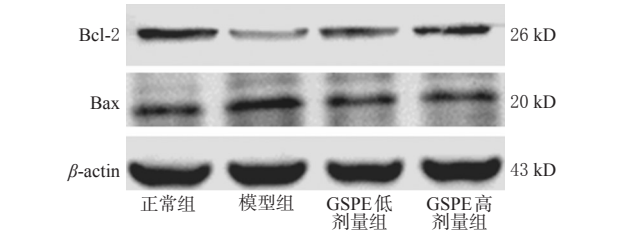


图2 各组小鼠肝组织中Bcl-2、Bax蛋白表达电泳图
Fig 2 Electrophoretogram of the expression of Bcl-2 and Bax protein in liver tissue of mice in each group

表4 各组小鼠肝组织中Bcl-2、Bax蛋白表达检测结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 4 The expression of Bcl-2 and Bax protein in liver tissue of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Bcl-2/β-actin	Bax/β-actin	Bcl-2/Bax
正常组	0.34 ± 0.02	0.30 ± 0.05	1.11 ± 0.10
模型组	0.22 ± 0.07*	0.53 ± 0.16*	0.42 ± 0.08**
GSPE低剂量组	0.30 ± 0.08 ^{##}	0.33 ± 0.05 ^{##}	0.91 ± 0.10 ^{##}
GSPE高剂量组	0.32 ± 0.06 ^{##}	0.32 ± 0.03 ^{##}	0.99 ± 0.11 ^{##}

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

Note: vs. normal group,* $P<0.05$,** $P<0.01$; vs. model group,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

3.6 肝组织中p62蛋白表达检测结果

与正常组比较,模型组小鼠肝组织中p62蛋白表达明显减弱($P<0.01$);与模型组比较,GSPE低、高剂量组小鼠肝组织中p62蛋白表达明显增强($P<0.01$)。各组小鼠肝组织中p62蛋白表达电泳图见图3、检测结果见图4。

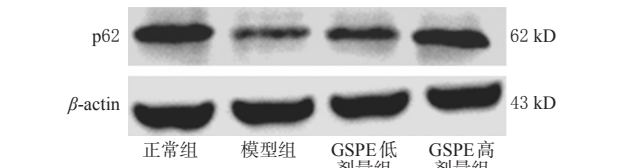


图3 各组小鼠肝组织中p62蛋白表达电泳图
Fig 3 Electrophoretogram of the expression of p62 protein in liver tissue of mice in each group

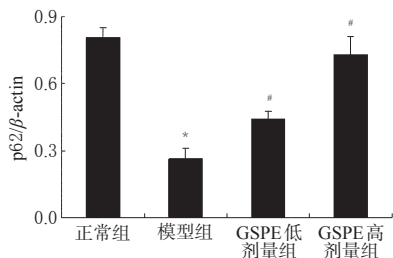


图4 各组小鼠肝组织中p62蛋白表达检测结果

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.01$

Fig 4 The expression of p62 protein in liver tissue of mice in each group

Note: vs. normal group, * $P<0.01$; vs. model group, # $P<0.01$

3.7 肝组织中PCNA蛋白表达观察结果

模型组小鼠肝组织中棕黄色颗粒颜色较浅,提示PCNA蛋白表达较弱;GSPE低、高剂量组小鼠肝组织中棕黄色颗粒变深,表达PCNA的细胞核的数量明显增加,提示PCNA表达显著增强。各组小鼠肝组织中PCNA蛋白表达观察结果见图5。

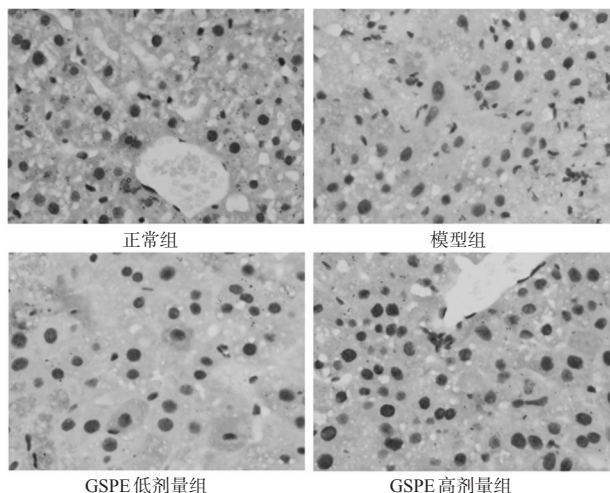


图5 各组小鼠肝组织中PCNA蛋白表达观察结果(×400)

Fig 5 The expression of PCNA in liver tissue of mice in each group(×400)

4 讨论

肝脏是人体最大且机能最复杂的重要代谢器官,其解毒和抗氧化系统对人体有重要的保护作用,肝功能损伤会导致代谢障碍并影响其他脏器功能,严重的甚至会危及生命^[1]。氧化应激是化学性伤害(如酒精中毒、药物或毒性肝病、脂肪肝)和病毒性侵害(如病毒性肝炎)等许多因素造成肝损伤的重要发病机制^[4]。因此研究抗肝氧化应激损伤的药物并阐明其作用机制具有非常重要的意义。已有研究表明,GSPE对各种原因引起的肝损伤模型动物均有保护作用,本文主要是探讨其发挥保护作用的机制,因此在本实验中未设置阳性对照组。

肝脏大体观察结果和病理观察结果表明,与模型组比较,GSPE给药组小鼠肝脏体积明显减小,肝组织中灰白色小结减少,肝细胞坏死明显减少,肝脏系数明显降低,表明GSPE对肝损伤有一定改善作用。肝细胞有旺盛的代谢功能,含有丰富的酶类(如AST、ALT),其活力能灵敏地反映肝细胞功能^[3]。本实验结果表明,模型组小鼠血清中AST、ALT活性明显升高,表明CCl₄诱导肝细胞损伤,使肝细胞膜通透性增强,使得AST、ALT

释出胞外。而与模型组比较,GSPE组小鼠血清中AST、ALT活力明显降低。以上结果进一步表明GSPE对CCl₄诱导的小鼠氧化性肝损伤具有显著的保护作用。

Bax为促凋亡基因,Bcl-2为抗细胞凋亡基因,Bcl-2/Bax比值对细胞凋亡的发生具有决定性作用^[7]。本研究结果提示GSPE可升高Bcl-2/Bax的比值而抑制肝组织细胞凋亡。自噬为Ⅱ型程序性细胞死亡,p62为自噬的标志性蛋白,越来越多的证据表明p62可以作为多种泛素化底物选择性自噬的受体,募集泛素化蛋白通过自噬途径降解,以维持细胞内环境的稳定^[8]。因此,当自噬增加时,p62的表达明显降低。本实验结果表明,与模型组比较,GSPE低、高剂量组小鼠肝组织中p62蛋白表达明显升高。PCNA是反映细胞增殖能力的重要指标,当细胞受到损伤时,首先表现为细胞增殖能力的降低^[9]。由免疫组化结果可知,GSPE低、高剂量组小鼠的肝组织中PCNA的表达明显升高,这提示GSPE可促进肝组织细胞的增殖从而发挥抗氧化性肝损伤的作用。

综上所述,100、200 mg/kg GSPE对CCl₄诱导的小鼠氧化性肝损伤具有显著的保护作用;其作用机制可能与GSPE促进小鼠肝细胞的增殖、抑制肝组织细胞的凋亡和自噬作用相关。

参考文献

- [1] Sunami Y, Leithäuser F, Gul S, *et al*. Hepatic activation of IKK/NF-κB signaling induces liver fibrosis via macrophage-mediated chronic inflammation[J]. *Hepatology*, 2012, 56(3):117.
- [2] Sahreen S, Khan MR, Khan RA. Hepatoprotective effects of methanol extract of Carissa opaca leaves on CCl₄-induced damage in rat[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2011, 11(7):48.
- [3] 庞文箫,李勇军,李勇文,等.蝉翼藤中甲基阿魏酸对CCl₄致急性肝损伤小鼠模型的影响[J]. *中国药房*, 2015, 26(1):21.
- [4] 邹金发,刘晓光,齐凤杰,等.葡萄籽原花青素减轻小鼠急性化学性肝损伤[J]. *基础医学与临床*, 2012, 32(10):1198.
- [5] 李静,钟进义,蔡晓,等.葡萄原花青素对乙醇诱发小鼠肝细胞增殖活性损伤的防护作用[J]. *青岛大学医学院学报*, 2011, 47(4):317.
- [6] 张明月,郑爱英,赵春红,等.葡萄籽提取物原花青素对溴苯诱导小鼠肝氧化损伤拮抗作用研究[J]. *现代预防医学*, 2008, 35(1):55.
- [7] 杨连君,曹雪涛,于益芝. Bcl-2, bax与肿瘤细胞凋亡[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2003, 10(3):232.
- [8] Schneider JL, Cuervo AM. Liver autophagy: much more than just taking out the trash[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014, 11(3):187.
- [9] Ando T, Kawabe T, Ohara H, *et al*. Involvement of the interaction between p21 and proliferating cell nuclear antigen for the maintenance of G₀/M arrest after DNA damage[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(46):42971.

(收稿日期:2015-11-07 修回日期:2016-01-16)

(编辑:林 静)