

维生素C和维生素E对小鼠化学性肝损伤的预防性保护作用

孙设宗, 唐微, 胡承江, 孟新云

■背景资料

我国的肝炎发病率较高, 近年来乙醇性肝损伤有逐年增加的趋势, 各种原因引起的肝损伤, 自由基引起的氧化应激是公认原因之一, VE和VC能够有效的清除自由基, 具有较强的抗氧化作用, 探讨增加食物中VC和VE对实验性肝损伤的预防性保护及其作用机制, 可进一步拓展VE和VC在临床上的应用。

孙设宗, 唐微, 郧阳医学院生化与免疫学实验室 湖北省十堰市 442000

胡承江, 郧阳医学院病理学教研室 湖北省十堰市 442000

孟新云, 郧阳医学院医疗保健中心 湖北省十堰市 442000

郧阳医学院中青年基金项目, No. 2005ZQY02

通讯作者: 孙设宗, 442000, 湖北省十堰市人民南路30号, 郧阳医学院生化与免疫学实验室, sunshezhun@yahoo.com.cn

电话: 0719-8875324

收稿日期: 2006-07-20 接受日期: 2006-08-10

Protective effect of vitamin C and E against chemical liver injury in mice

She-Zong Sun, Wei Tang, Cheng-Jiang Hu, Xin-Yun Meng

She-Zong Sun, Wei Tang, Laboratory of Biochemistry and Immunity, Yunyang Medical College, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Cheng-Jiang Hu, Department of Pathology, Yunyang Medical College, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Xin-Yun Meng, Healthcare Department of Yunyang Medical College, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Supported by the Middle-aged and Young Talent Project of Yunyang Medical College, No. 2005ZQY02

Correspondence to: She-Zong Sun, Laboratory of Biochemistry and Immunity, Yunyang Medical College, 30 Renmin South Road, Shiyan 442000, Hubei Province, China. sunshezhun@yahoo.com.cn

Received: 2006-07-20 Accepted: 2006-08-10

Abstract

AIM: To find out the protective effect of vitamin C (VC) and vitamin E (VE) against chemical liver injury caused by carbon tetrachloride (CCl_4).

METHODS: A total of 60 Kunming rats were randomly divided into 5 groups: control group, model group, VC-treated group, VE-treated group, and VC plus VE group. After 10 days of treatment, 1.5 mL/L CCl_4 were injected into all the mice except those in control group to induce liver injury. Finally, the serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and tissue contents of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD) were examined. The morphological changes of liver tissues were observed under light microscope.

RESULTS: VC and VE significantly decreased

the levels of serum ALT and AST (2277.12 ± 1187.90 , 2163.76 ± 1412.11 nkat/L vs 4527.07 ± 1019.37 nkat/L, $P < 0.01$), and tissue content of MDA (4.37 ± 0.49 , 3.26 ± 0.71 $\mu\text{mol/g}$ vs 9.25 ± 2.74 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.01$). Under microscope, liver injury was greatly decreased in VC and VE group, especially in VC + VE group.

CONCLUSION: Both VC and VE can prevent liver tissues from chemical injury, and combined use presents a better effect.

Key Words: Vitamin C; Vitamin E; Liver injury; Protective effect

Sun SZ, Tang W, Hu CJ, Meng XY. Protective effect of vitamin C and E against chemical liver injury in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(14):1646-1649

摘要

目的: 探讨维生素C(VC)和维生素E(VE)对 CCl_4 引起化学性肝损伤的预防性保护作用。

方法: 昆明种小鼠60只随机分5组, 设正常对照组、病理模型组、VC保护组、VE保护组、VC+VE保护组, 饲养10 d, 除正常对照组外, 其余各组ip 1.5 mL/L CCl_4 致小鼠化学性肝损伤, 测定小鼠血清中ALT, AST及肝细胞中MDA, GSH, SOD, HE染色光镜下观察肝细胞形态变化。

结果: VC和VE保护组能显著降低血清中ALT和AST(2277.12 ± 1187.90 , 2163.76 ± 1412.11 nkat/L vs 4527.07 ± 1019.37 nkat/L, $P < 0.01$)以及肝细胞中脂质过氧化物MDA的含量(4.37 ± 0.49 , 3.26 ± 0.71 $\mu\text{mol/g}$ vs 9.25 ± 2.74 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.01$)。镜下观察肝损伤明显减轻, 体外抗氧化实验能显著性的抑制脂质过氧化物MDA生成, 联合应用有协同效应。

结论: VC和VE对化学性肝损伤有预防性保护作用。

关键词: 维生素C; 维生素E; 肝损伤; 预防性保护

孙设宗, 唐微, 胡承江, 孟新云. 维生素C和维生素E对小鼠

鼠化学性肝损伤的预防性保护作用. 世界华人消化杂志 2007;15(14):1646-1649
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1646.asp>

0 引言

肝炎是一种严重危害人们身体健康的传染病之一, 我国是肝炎高发区. 据调查统计, 仅乙型肝炎表面抗原的检出率达10.09%^[1], 近年来酒精性肝损伤也呈现不断增加的趋势^[2], 尽管各种肝炎所致肝损伤的机制尚不十分清楚, 但氧化应激是公认的起始原因之一. 资料表明Vitamin C(VC)和Vitamin E(VE)能清除活性氧自由基以及脂质过氧化自由基^[3-5]. 但VC, VE对小鼠化学性肝损伤预防性保护作用研究很少, 我们在昆明种小鼠饲料中加入VC, VE, 用四氯化碳(CCl₄)诱导化学性肝损伤, 探讨VC, VE对化学性肝损伤预防性保护作用, 为进一步拓展VC, VE在临床上的应用和保健提供实验基础.

1 材料和方法

1.1 材料 昆明种3月龄小鼠60只, 雌雄各半, 体重28-36 g, 本院动物中心供给. 丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)试剂盒(南京建成生物工程公司), VE和VC(浙江医药股份有限公司新昌制药厂), 其余为国产分析纯生化试剂. ZS83-1型内切式组织匀浆机(浙西机械厂), MDF-382E型超低温冰箱(Sony公司), 752型分光光度计(上海第二光学仪器厂), RA-50半自动生化分析仪(Technicon公司).

1.2 方法 60只小鼠随机分5组, 每组雌雄各半共12只, 分笼饲养. 正常对照组: 常规饲料, 自由饮水; 病理造模组: 常规饲料, 自由饮水; VE保护组: 自由饮水, 常规饲料中加VE(250 mg/kg饲料); VC保护组: 自由饮水, 常规饲料中加VC(1500 mg/kg饲料)^[6], 由于VC极易氧化, 应少量多次配制, -20℃冰箱中保存, 使用前取出至室温喂养; VE+VC保护组: 自由饮水, 饲料中加VC和VE. 预防性饲养10 d, 第11天正常对照组腹腔注射豆油溶液, 其余各组腹腔注射1.5 mL/L CCl₄豆油溶液(10 mL/kg体重)^[7], 24 h各组小鼠眼球取血后处死小鼠, 分离血清测定各组的ALT和AST. 取出肝脏后立即取肝小叶约0.2 g固定, 按常规方法切片, HE染色, 观察肝细胞形态变化. 其余肝脏置冰生理盐水中洗净血液, 用滤纸吸去水分称质量, 用PBS按1:10稀释冰浴下匀浆, 4000 r/min离心5 min, 取上清液用双缩脲法

测肝匀浆中蛋白质含量. 按试剂盒要求测MDA, GSH, SOD的含量. 取上述各组肝匀浆(4 g蛋白/L)0.25 mL置相应的试管中, 除正常对照组外, 其余各组加6 mmol/L FeSO₄ 40 μL, 60 mmol/L H₂O₂ 40 μL, pH7.4的PBS缓冲液500 μL, 正常对照组加PBS补充容量至等量. 各管置37℃水浴中保温25 min启动反应产生脂质过氧化物, 加150 mL/L的三氯醋酸1.0 mL结束反应, 6.7 g/L的硫代巴比妥酸溶液1.0 mL, 500 mL/L的冰醋酸1.0 mL, 置沸水中20 min取出, 冷却后离心用752分光光度计测532 nm的A值, 测定MDA含量^[5]. 计算VC, VE对脂质过氧化物MDA产生的抑制率, 抑制率计算方法按文献[8].

统计学处理 用SPSS10.0软件进行方差分析.

2 结果

2.1 VE, VC对CCl₄肝损伤小鼠血清ALT, AST的影响 病理造模组与正常对照组比较, 能显著性的升高血清中ALT和AST的活性($P<0.01$), 说明CCl₄所致肝损伤模型是成功的. 与病理造模组比较, VE或VC组, 都能显著的降低血清中ALT和AST的活性($P<0.01$), 联合应用与单独应用比较有协同效应($P<0.05$, 表1).

2.2 VE, VC对CCl₄肝损伤小鼠肝组织中MDA, SOD, GSH含量的影响 病理造模组与正常对照组比较, 能显著性的升高肝细胞中MDA的含量, 说明CCl₄可导致急性肝损伤. 饲料中加入VC, VE能显著降低肝细胞中MDA的含量($P<0.01$). VE组和VC组, 与模型组和对照组比较各组之间SOD, GSH并无显著性差异, 虽然SOD是清除自由基主要的酶, GSH可提供还原当量参与自由基的清除; 实验表明, 增加饲料中的VE、VC, SOD和GSH的含量不一定升高, 但均可显著降低脂质过氧化物MDA的含量. 相反模型组则有代偿性升高的趋势. 提示VC, VE可能具有对抗自由基的生成或直接清除自基的作用(表1).

2.3 VE, VC对体外诱导脂质过氧化物MDA产生的抑制作用 将肝匀浆中加入6 mmol/L FeSO₄ 50 μL, 10 mmol/L H₂O₂ 50 μL, 在保温过程中可诱导脂质过氧化物的生成, 氧化对照组A₅₃₂为0.697, 明显高于空白对照组(0.359), 说明诱导肝匀浆产生脂质过氧化物是成功的, 饲料中加入VE, VC小鼠肝匀浆, 与氧化对照组比较可明显的抑制脂质过氧化物的生成, A₅₃₂显著降低, VE, VC应用对脂质过氧化产物MDA生成的抑制率分别为76.18%±9.03%和73.26%±9.89%, 联合

■相关报道

本课题组前期已进行了镁离子、VE和VC对肝损伤保护作用的研究, 实验表明镁离子可对抗自由基的生成, 直接清除自由基有作用, 增加抗氧化酶的活性, 与VC和VE联合应用有协同作用, 研究成果已在相关核心期刊上发表. (注: 该研究课题已申报2007年省级科研项目, 已通过审批, 可了解本课题组的后续研究.)

■创新盘点

本研究证明VE和VC能够增加机体的抗氧化能力有效的对抗和清除自由基,降低肝损伤时升高的ALT和AST稳定细胞膜的结构,降低MDA的含量。目前有资料报道VC和VE可增加机体的免疫力,可改善红细胞膜的流动性,提高淋巴细胞增殖活性,但其作用机制尚需进一步探讨。

表 1 VC, VE对CCl₄肝损伤小鼠ALT, AST, MDA, SOD和GSH含量的影响(mean ± SD, n = 12)

分组	ALT(nkat/L)	AST(nkat/L)	MDA(μmol/g pro)	GSH(mg/g pro)	SOD(nkat/mg pro)
正常对照	656.29 ± 290.89	1398.11 ± 325.73	5.146 ± 1.50	32.71 ± 7.52	2378.95 ± 788.99
病理造模组	4527.07 ± 1019.37 ^b	3835.43 ± 751.65 ^b	9.25 ± 2.74 ^b	34.8 ± 6.08	2649.36 ± 700.80
VE保护组	2163.76 ± 1412.11 ^d	2029.07 ± 622.12 ^d	3.26 ± 0.71 ^d	28.88 ± 9.75	2372.14 ± 547.94
VC保护组	2277.12 ± 1187.90 ^d	2461.32 ± 609.62 ^d	4.37 ± 0.49 ^d	33.75 ± 6.44	2454.65 ± 552.94
VC+VE保护组	1446.12 ± 1041.64 ^a	1593.98 ± 731.97 ^a	2.98 ± 0.68 ^a	31.26 ± 5.92	2410.31 ± 472.09

^aP<0.05 vs VC, VE保护组; ^bP<0.01 vs 正常对照; ^dP<0.01 vs 病理造模组。

应用抑制率为81.06%±10.61%(表2), 体外实验证明VE, VC可对抗自由基生成, 抑制脂质过氧化物MDA产生, 联合应用抑制作用加强。

2.4 VE, VC对CCl₄肝损伤形态改变的影响 光学显微镜下观察正常对照组: 肝小叶内的肝细胞胞质致密、红染, 肝细胞索、肝窦结构清晰; 病理造模组: 肝小叶内的肝细胞胞质广泛疏松淡染, 有较多灶状气球样变性、凝固性坏死及炎性细胞浸润; VC, VE保护组: 肝小叶内的肝细胞仅见轻度疏松化及少量炎性细胞浸润。

3 讨论

CCl₄对肝细胞所致化学性肝损伤, 其毒性主要是通过脂质过氧化作用引起肝损伤^[8]。CCl₄进入机体后由肝微粒体细胞色素P₄₅₀代谢, 生成三氯甲基自由基(·CCl₃)、氯离子自由基(·Cl)攻击肝细胞膜上磷脂分子引起脂质过氧化, 导致脂质过氧化产物MDA升高; 此外, 在·CCl₃起动的过氧化连锁反应中, 尚可产生毒性更强的超氧阴离子(O₂⁻)和氢氧阴离子(OH·)自由基, 自由基与肝微粒体脂质和蛋白质发生共价结合, 损伤肝细胞膜结构与功能的完整性, 从而使胞质内的可溶性酶如ALT, AST等渗入血液中, 引起肝细胞内酶活性降低, 影响物质代谢, 细胞呼吸受影响ATP产生减少, 最后导致肝细胞气球样变^[9], 严重时可引起肝细胞变性坏死。本研究表明, CCl₄所致化学性肝损伤, 通过脂质过氧化作用产生过量的自由基广泛的损伤肝细胞, 导致模型组小鼠MDA, ALT, AST显著升高, 肝小叶内的肝细胞胞质广泛疏松淡染, 有较多的灶状气球样变性、及炎性浸润。VE和VC保护组, 可显著降低(P<0.01)小鼠肝匀浆中MDA的含量和血清中ALT, AST的含量; VE, VC对体外诱导脂质过氧化物MDA产生, 有显著性的抑制作用, 其抑制率分别为73.26%和76.18%, 联合应用抑制率为81.06%; HE染色, 光学显微镜观察肝细胞形态

表 2 VE, VC对体外诱导脂质过氧化物MDA产生的抑制作用(mean ± SD, n = 12)

分组	A ₅₃₂	抑制率(%)
空白对照	0.359 ± 0.056	
氧化对照组	0.697 ± 0.071	
VC组	0.187 ± 0.069	73.26 ± 9.89
VE组	0.166 ± 0.063	76.18 ± 9.03
VC+VE组	0.135 ± 0.074	81.06 ± 10.61

损伤程度明显减轻; 表明VE, VC对化学性肝损伤有预防性保护作用。GSH, SOD虽然是生物体内重要清除自由基的还原当量和酶, 但本研究GSH, SOD各组之间的变化无显著性差异, 说明VC, VE有效的清除CCl₄所致化学性肝损伤产生的自由基, 使细胞内产生的自由基处于较低的水平。而病理模型组SOD则有升高的趋势, 可能是模型组由于急性肝损伤产生较多的自由基, 当还未损伤DNA时则可诱导SOD的合成, 引起SOD代偿性升高。VE作为脂溶性抗氧化剂主要存在于质膜中, 能与不饱和脂肪酸竞争脂质过氧基, 有效的阻断自由基连锁反应, 终止脂质过氧化过程。VC抗氧化作用的机制一方面能有效清除O₂⁻, H₂O₂, OH·, LOO·等自由基^[10], 可中断自由基的连锁反应, 减少自由基对膜的攻击, 从而降低体内脂质过氧化物MDA的含量, 是机体内广谱抗氧化物质。另外VC还能够促进Se的吸收^[10], 而Se是GSH-Px的辅酶; VC还可保持VE的还原状态, 间接性的增加抗氧化作用, VC, VE联合应用有协同效应。

总之, 在小鼠饲料中增加VC, VE能有效的对抗和清除自由基, 终止脂质过氧化过程, 对CCl₄所致化学性肝损伤有预防性保护作用。提示人们在日常生活中注意提高膳食中VC, VE的含量, 对各种氧化应激所致肝损伤有预防性保护作用。

4 参考文献

- 1 杨婧. 某高校新生乙型肝炎病毒感染状况. 中国学校卫生 2004; 25: 624-625
- 2 黄琼, 黄俊明, 陈瑞仪, 赵敏, 杨国光. 大豆、枸杞子、山楂复合提取物对小鼠化学性肝损伤的保护作用. 营养学报 2003; 25: 208-211
- 3 Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993; 300: 535-543
- 4 Andersen HR, Andersen O. Effects of dietary alpha-tocopherol and beta-carotene on lipid peroxidation induced by methyl mercuric chloride in mice. *Pharmacol Toxicol* 1993; 73: 192-201
- 5 杨敬华, 徐兆发, 尹忠伟, 于佳明, 孙炜, 李晶. 维生素C和维生素E对汞毒性的拮抗作用. 中国公共卫生 2004; 20: 453-454
- 6 周显青, 李胜利, 王晓辉, 乔欣. 维生素C多聚磷酸脂对小鼠肝质过氧化物和抗氧化酶的影响. 动物学报 2004; 50: 370-374
- 7 汪求真, 马爱国, 孙永叶, 薛美兰, 张秀珍, 梁惠. 大剂量维生素E对大鼠抗氧化和DNA损伤的影响. 营养学报 2005; 27: 467-470
- 8 杨建雄, 原江峰, 李发荣. 柿叶黄酮的体外抗氧化作用研究. 营养学报 2003; 25: 215-217
- 9 Waterfield CJ, Turton JA, Scales MD, Timbrell JA. Reduction of liver taurine in rats by beta-alanine treatment increases carbon tetrachloride toxicity. *Toxicology* 1993; 77: 7-20
- 10 孙永叶, 马爱国, 张秀珍, 韩秀霞. 维生素C缺乏对豚鼠抗氧化能力及红细胞膜流动性的影响. 卫生研究 2005; 34: 329-330

■同行评价

本文采用四氯化碳诱导小鼠形成化学性肝损伤模型, 采用抗氧化剂维生素C和维生素E进行预防性保护, 有一定的临床价值.

电编 郭海丽 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2007 年原位肝脏移植新技术及进展学习班通知

本刊讯 为促进国内肝脏移植领域的交流与合作, 为拟开展肝脏移植的同道提供技术支持, 提高我国肝移植的技术水平, 推动肝移植的健康发展, 中山大学附属第三医院肝脏移植中心将于2007-08-29/09-02与世界华人消化杂志社合作举办“原位肝移植新技术及进展”学习班, 由中山大学器官移植研究所所长陈规划教授主持, 并邀请海内外肝移植知名专家授课, 就目前我国肝移植存在的重点和难点问题以及近几年来肝移植技术的新进展进行学术讲座.

中山大学附属第三医院肝脏移植中心是广东省器官移植研究所和中山大学器官移植研究所挂靠单位, 也是广东省卫生厅重点专科和广东省器官移植学会主任委员单位. 目前, 已开展近1000例肝脏移植术, 术后1 a生存率超过80%, 居国内领先水平. 本中心已举办三期肝脏移植技术学习班, 并协助国内60余家单位开展了肝脏移植术. 本项目为2007年国家级继续医学教育项目, 项目编号为: 2007-04-10-024, 授予 I 类学分14分. 授课内容主要涉及肝脏移植手术技巧、高危受者的麻醉管理、重症感染病人的无肝素化持续血液净化治疗、个体化免疫抑制方案、术后随访管理系统、抗乙型肝炎治疗新策略、西罗莫司及超声造影技术在肝脏移植中的应用等方面. 学习对象为省级、地市级医院的医护人员.

收费标准: 培训费900元/人(统一安排食宿, 费用自理)

通讯地址: 广州市天河路600号, 中山大学附属第三医院肝脏移植中心 邮编: 510630 联系人: 汪根树 电话: 020-87595523 传真: 020-87595523 E-mail: chengying_827@163.com.