

盐藻 β -胡萝卜素对鹌鹑脂肪肝的影响*

王春波 兰孝贞 张鲁平[†] 张仁亮 张敏
王玉贞 王海青 周绪祥 张京浦^{††}

(青岛大学医学院 青岛 266021)

[†](青岛市第二人民医院 青岛 266033)

^{††}(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 盐藻 β -胡萝卜素由中国科学院海洋研究所提供(9505028)。用综合法复制鹌鹑脂肪肝动物模型,给予盐藻 β -胡萝卜素以观察其预防高脂饲料致鹌鹑脂肪肝的作用。分组喂以不同饲料,对肝脏进行肉眼和病理组织学检查。结果表明,II-VII组的肝系数与I组相比有较明显的升高($p < 0.05$);盐藻 β -胡萝卜素在6.25mg/kg—25mg/kg剂量范围内能使肝系数降低,肝脏脂肪病变程度减轻,与II组比较有统计学意义($p < 0.05$, $p < 0.01$)。实验证明,自盐泽杜氏藻中提取的以顺式结构为主的 β -胡萝卜素具有对抗肝脏脂肪病变的作用。

关键词 盐藻 β -胡萝卜素 脂肪肝 组织病理学检查 鹌鹑

学科分类号 S852.33

脂肪肝作为肝脏疾病的中间病理过程,在病毒性肝炎、药物中毒性肝炎、饮酒过度,以及肥胖症时均可发生。近年来,许多学者证明自由基在肝损伤中起重要作用,而目前公认有抗自由基作用的维生素E,在降低脂质过氧化产生的同时,能减轻肝脏的损伤(胡晓明等,1991; Bipink, 1990)。因此,在病变的早期及时应用自由基清除剂,能使脂肪肝的病理向健康方向转化。盐藻 β -胡萝卜素是从盐泽杜氏藻中分离提取、以顺式结构为主的化合物,王春波等(1998)前已证明,盐藻 β -胡萝卜素具有抗氧化作用,通过调节脂质过氧化物(LPO)代谢,而预防动脉粥样硬化的发生、发展。本研究采用综合法,复制鹌鹑脂肪肝动物模型,从形态学角度观察盐藻 β -胡萝卜素的作用,以期为其推广和应用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 盐藻 β -胡萝卜素(β C),由中国科学院海洋研究所提供(编号9505028),临用时用花生油稀释成所需浓度;维生素E由青岛海洋渔业公司水产品加工厂惠赠;胆固醇为广州化学试剂分公司分装,批号8903703。

1.1.2 动物 日本种雄性鹌鹑,由青岛大学医学院动物科提供(9506003)。

1.1.3 高脂饲料(高饲) 本室自配,100g普通饲料(普饲)中含猪油15g,胆固醇1g。

* 国家“八五”攻关课题资助项目,85-08-07号。王春波,女,出生于1954年3月,教授。Email:qmmcl@public.qd.sd.cn

收稿日期:1998-05-06,收修改稿日期:1999-04-09

1.1.4 仪器 BH-I型显微镜(OLYMPUS)。

1.2 方法

将 84 只雄性鹌鹑(体重为 $100.2 \pm 12.8\text{g}$)随机分为 7 组。I 组(普饲对照组): 喂以普通饲料 + 花生油; II 组(高饲对照组): 喂以高饲 + 花生油; III 组: 高饲 + βC 6.25mg/kg ; IV 组: 高饲 + βC 12.5mg/kg ; V 组: 高饲 + βC 25mg/kg ; VI 组: 高饲 + βC 50mg/kg ; VII 组: 高饲 + 维生素 E 50mg/kg 。均进行灌胃(ig), 每日 1 次, 连续 56d。

给药后 8 周, 将鹌鹑断头处死, 分离肝脏, 计算肝系数(陈奇, 1993), 同时进行肉眼观察和病理组织学检查。根据光镜下肝小叶内肝细胞脂肪变性的程度, 将肝脏病变分成 4 级: 正常肝组织结构为 1 级; 小脂滴约占肝细胞浆的 25%, 为轻度肝脂肪病变(2 级); 肝细胞体积增大, 中、小脂滴约占胞浆的 25%—50%, 为中度肝脂肪病变(3 级); 部分肝细胞酷似脂肪细胞, 肝窦挤压明显, 大、中脂滴约占肝细胞浆的 50%—75%, 为重度肝脂肪病变(4 级)。

等级资料多组间的比较用 H 检验, 多组均数间比较用 F 检验。

2 结果

实验结果表明, 高饲各组肝系数明显高于普饲对照组(I 组), 均有显著性差异($p < 0.05$); 而高饲加不同剂量 βC 的各组(III、IV、V、VI 组)和加维生素 E 的 VII 组的肝系数又明显低于高饲对照组(II 组)($p \ll 0.05$), 见表 1。

表 1 盐藻 β -胡萝卜素对肝系数和体重的影响
Tab.1 Effects of βC on the liver index and body weight

组别	体重(g)	肝重(g)	肝系数(肝重/体重)
I	155.54 ± 4.77	2.92 ± 0.26	1.88 ± 0.15
II	157.50 ± 4.79	5.63 ± 0.27	$3.59 \pm 0.19^{1)}$
III	159.50 ± 7.23	5.02 ± 0.32	$3.18 \pm 0.17^{1) 2)}$
IV	160.42 ± 8.03	5.04 ± 0.42	$3.14 \pm 0.35^{1) 2)}$
V	159.58 ± 7.76	5.09 ± 0.54	$3.19 \pm 0.27^{1) 2)}$
VI	158.75 ± 8.93	5.48 ± 0.47	$3.46 \pm 0.23^{1)}$
VII	156.67 ± 5.89	4.91 ± 0.44	$3.12 \pm 0.22^{1) 2)}$

注: 表中数据为平均值 \pm 标准差, $n=12$; 1) 与 I 组比较, $p < 0.05$, 2) 与 II 组比较, $p < 0.05$

肉眼观察, 普饲组动物肝脏外观未见明显异常。而高饲对照组动物肝脏明显变大, 色泽为灰黄和灰红相间, 严重的整个肝脏均为灰黄色, 切面油腻, 呈脂肪肝外观。给药各组(VI 组除外)动物的肝脏变化较轻。

显微镜观察, 普饲组肝脏结构无明显异常变化, 肝窦和肝索相间以中央静脉为中心, 呈放射状有规则地排列, 肝细胞核居中, 肝小叶大致呈六角形。高饲对照组(II 组)动物肝脏均呈现不同程度脂肪病变, 病变肝细胞球形增大, 胞浆内可见数量不等、大小不一的脂肪空泡, 将细胞核挤向周边, 肝细胞索排列紊乱, 肝窦隙缩小, 该组 12 个样品中有 10 个为中、重度脂肪变性。 βC 各剂量组(VI 组除外)和维生素 E 组肝脂肪病变程度较轻, V 组、VII 组作用最佳, 其中 1/3 动物未见异常变化。III、IV 组以轻度脂肪变为主。结果表明, 各用药组(VI 组除外)肝脂肪病变程度与高饲对照组(II 组)比较均有显著性差异($p < 0.05$,

$p < 0.01$), 见表 2 和图 1.

表2 益藜 β -胡萝卜素对肝脂肪病变的影响
Tab.2 Effects of β C on fatty degeneration in liver

组别	脂肪肝级数				Σ	\bar{X}
	1	2	3	4		
I	10	2			14	1.17
II		2	5	5	39	3.25
III	1	4	4		21	2.33*
IV	1	8	2	1	27	2.25*
V	4	5	3		23	1.92**
VI		4	5	3	35	2.92
VII	4	7	1		21	1.75**

注: III组 $n=9$, 其余组 $n=12$. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$

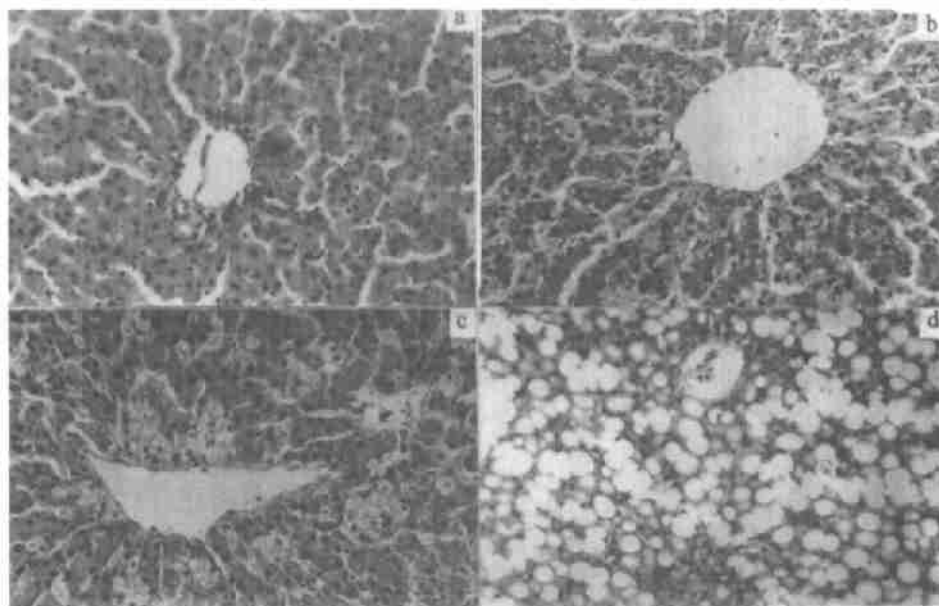


图1 肝脂肪病变结果

Fig.1 Results of fatty degeneration in liver

- a. 正常肝细胞(1级); b. 轻度肝脂肪病变(2级), 肝细胞胞浆内出现较小的脂肪空泡;
c. 中度肝细胞病变(3级), 肝细胞胞浆内有较大的脂肪空泡形成; d. 重度肝脂肪病变(4级),
脂肪细胞融合占据整个胞浆, 肝细胞索排列紊乱. $\times 200$

3 讨论

脂肪变性大多见于代谢旺盛、耗氧多的器官, 如肝、肾、心等。由于肝在脂肪代谢中处于中心地位, 所以肝脂肪病变最为常见。研究结果表明, 接受高胆固醇高脂饲料 8 周的动物, 肝系数增大, 肝组织学病理改变符合脂肪肝的特点, 表明本文以综合法成功诱导出鸭脂肪肝病理模型。

实验中, 对病变定性或进行半定量分析的肝系数和组织病理学观察, 是衡量肝脂肪病

变程度的重要指标。口服 β C剂量在6.25mg/kg—25mg/kg时,能降低肝系数,对肝脏脂肪变的缓解作用随剂量递增而增强,呈现剂量依赖关系,以25mg/kg剂量为佳,为 β C抗脂肪肝的应用提供了重要依据。

脂肪肝主要是脂肪代谢障碍,本实验中脂肪肝的形成主要是胆固醇、脂肪的堆积,如不及时治疗,病变则有可能加重,继而发生肝组织纤维化,甚至肝硬化(Chojkier *et al*, 1998)。 β C对肝脏具有保护作用,在抑制脂肪肝形成的同时,还防止了肝脏的进一步损伤。

自由基对肝脏的毒性作用是通过超氧阴离子,使内质网膜上的多价不饱和脂肪酸发生脂质过氧化,破坏肝细胞内膜结构。同时,自由基与膜蛋白及酶蛋白结合,降低了肝细胞内抗氧化剂和蛋白含量,从而影响物质在肝细胞内的代谢。作者在以往的研究中已证明(王春波等,1998),给予高脂饲料2周,鹌鹑血清脂质过氧化物的最终代谢产物丙二醛(MDA)含量就明显升高,提示高脂在体内产生了脂质过氧化,而脂质过氧化又与肝组织损伤和纤维生成有关,这与Bacon等(1983)观点一致。 β C在一定剂量范围内能降低脂肪肝鹌鹑血清的MDA(王春波等,1998),也能降低大鼠肝匀浆MDA含量,提高大鼠全血谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)的活性(实验室资料),说明 β C是通过提高GPX,减少脂质过氧化产生,保护肝细胞而抗脂肪病变的。

虽然 β C作为抗氧化剂,可减少肝脏脂质过氧化而抗脂肪病变,但大剂量50mg/kg组(VI组)鹌鹑的脂肪病变级数与对照组比较,统计学上无显著性差异($p > 0.05$)。这可能是胃肠道对大剂量 β C的吸收受限;亦可能是 β C必需在氧分压显著低于空气中的氧分压时方产生抗氧化作用,在高氧分压时,则失去其抗氧化作用,特别是在相对高浓度时(Burton *et al*, 1984)。提示 β C作为抗氧化剂,在一定剂量范围内才存在剂量依赖关系。

多项临床实验已经证实,肝病患者,尤其是肝硬化患者血清及肝组织中维生素A含量较正常人对对照明显降低(Rocchi *et al*, 1991; Leo *et al*, 1993),但是,维生素A的过量应用可造成肝脏毒性,从而使得维生素A的补充治疗大大受到限制。而Seifert等(1995)的动物实验表明, β C能降低由四氯化碳诱导的大鼠肝脏的炎症与纤维化程度。本文研究结果又证明,以顺式结构为主的盐藻 β -胡萝卜素具有对抗肝脏脂肪病变的作用。由此,作者认为盐藻 β -胡萝卜素作为天然的抗氧化剂和维生素A原,即能避免了直接补充维生素A所致的毒性,又不失为治疗各型肝损伤有开发前途的药物。

参 考 文 献

- 王春波,兰孝贞,张鲁平等. 1998. 盐藻 β -胡萝卜素对实验性动脉粥样硬化预防作用的研究. 中国海洋药物, 17(1):7—12
- 陈奇主编,1993. 中药药理研究方法学. 北京:人民卫生出版社,520—521
- 胡晓明,陈仁,1991. 实验性肝损伤体内、体外试验及维生素E对其保护作用的研究. 见:胡晓明,陈仁主编,全国病毒性肝炎防治讨论论文集. 北京:中国科学技术出版社,223—225
- Bacon B R, Tavill A T, Brittenham G M *et al*, 1983. Hepatic lipid peroxidation in vivo in rats with chronic iron overload. J Clin Invest, 71(1):429—439
- Bipink Sharma, 1990. Prevention of hepatocyte injury and peroxidation by iron chelator and α -tocopherol in isolated iron-loaded rat hepatocytes. Hepatology, 12(1):36—41

- Burton G W, Ingold K U, 1984. Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 334(4 649): 569—573
- Chojkier M, Lyche K D, Filip M, 1998. Increased production of collagen in vivo by hepatocytes and nonparenchymal cells in rats with carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. *Hepatology*, 8(8):808—902
- Leo M A, Rosman A S, Lieber C S, 1993. Differential depletion of carotenoids and tocopherol in liver disease. *Hepatology*, 17(6):977—986
- Rocchi E, Borghi A, Paolillo F *et al*, 1991. Carotenoids and liposoluble vitamins in liver cirrhosis. *J Lab Clin Med*, 118(2):176—185
- Seifert W F, Bosma A, Hendriks H F *et al*, 1995. Beta-Carotene (Provitamin A) decreases the severity of CCl₄-induced hepatic inflammation and fibrosis in rats. *Liver*, 15(1):1—8

EFFECTS OF BETA-CAROTENE FROM *DUNALIELLA SALINA* ON FATTY LIVER IN QUAILS

WANG Chun-bo, LAN Xiao-zhen, ZHANG Lu-ping[†], ZHANG Ren-liang,
ZHANG Min, WANG Yu-zhen, WANG Hai-qing, ZHOU Xu-xiang,
ZHANG Jing-pu^{††}

(Medical College of Qingdao University, Qingdao, 266021)

[†] (The Second People's Hospital of Qingdao, Qingdao, 266033)

^{††} (Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract The β -Carotene was extracted from single cell *Dunaliella salina* in Hainan Island between July and September. The animal model of hepatic steatosis was reproduced using the multiply methods, and antisteatotic effects of β -Carotene from *Dunaliella salina* on quails fed on high cholesterol, high fat and low protein diet were observed. 84 male quails of 8 weeks with a body weight of 100.2 ± 12.8 g were randomly divided into 7 groups: group I was fed with stock diet; group II hypercholesterol diet; groups III—VI hypercholesterol diet plus β -Carotene of 6.25mg/kg, 12.5mg/kg, 25mg/kg, 50mg/kg, respectively; group VII hypercholesterol diet plus Vitamin E 50mg/kg. All the quails were killed after 8 weeks. The ratio of the liver and body weight were calculated. The livers were examined by light microscopy. The results show that the ratio of liver and body weight were higher in group II—VII than in that of the normal diet group ($p < 0.05$). The ratio of liver and body weight were lower in III, IV, V group than that in II group ($p < 0.05$). Hepatic histopathological examinations show that the pathological changes of fatty liver in quails of β C 6.25mg—25mg/kg were alleviated. The percentage of the liver cell with denatured fat was lower than of the hypercholesterol control group ($p < 0.05, 0.01$). In conclusion, β -Carotene (cis) from *Dunaliella salina* has antisteatotic effects.

Key words *Dunaliella salina* β -Carotene Hepatic steatosis histopathology Quails

Subject classification number S852.33