

## 番茄红素对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用

张楠楠<sup>1</sup>, 陶瑾<sup>2</sup>, 姜民<sup>2</sup>, 高洁<sup>2\*</sup>, 白钢<sup>2</sup>

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 南开大学药学院, 天津 300071

**摘要:** **目的** 观察番茄红素对四氯化碳 (CCl<sub>4</sub>) 引起的小鼠急性肝损伤的保护作用。**方法** 将小鼠分为正常组、模型组、番茄红素组和阳性药联苯双酯组。番茄红素组和联苯双酯组分别用番茄红素和联苯双酯 ig 进行预给药干预, 正常组和模型组以溶剂 0.1% 羧甲基纤维素钠 ig, 连续给药 7 d 后 ip CCl<sub>4</sub> 致小鼠急性肝损伤。计算肝脏指数, 检测血清中谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 以及肝组织中的超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、乳酸脱氢酶 (LDH) 的水平, 并观察肝组织 HE 染色切片的病理变化。**结果** 番茄红素能显著降低急性肝损伤小鼠血清 ALT、AST 活性; 升高肝组织匀浆中 SOD 活力, 降低 MDA 含量和 LDH 活性; 病理切片表明给药组小鼠肝损伤均减轻。**结论** 番茄红素对 CCl<sub>4</sub> 致小鼠急性肝损伤具有保护作用, 其机制可能与番茄红素所具有抗脂质过氧化和清除体内过多的氧自由基的作用有关。

**关键词:** 番茄红素; 急性肝损伤; 保护作用; 小鼠

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2013)01-0014-04

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.01.004

## Protective effects of lycopene against acute hepatic injury induced by CCl<sub>4</sub> in mice

ZHANG Nan-nan<sup>1</sup>, TAO Jin<sup>2</sup>, JIANG Min<sup>2</sup>, GAO Jie<sup>2</sup>, BAI Gang<sup>2</sup>

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300071, China

**Abstract: Objective** To study the protective effects of lycopene against carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced acute hepatic injury in mice. **Methods** The mice were divided into four groups: normal, model, lycopene, and positive control (biphenyldicarboxylate) groups. The mice in lycopene and positive control groups were ig pretreated with lycopene and biphenyldicarboxylate once daily for consecutive 7 d, respectively. The mice in the normal and model groups were given 0.1% carboxymethylcellulose sodium (CMC-Na), the solvent, instead. Then, acute liver injury in mice was induced by ip injection of CCl<sub>4</sub>. After the mice were sacrificed, the hepatic indices were calculated. The activities of serum ALT and AST, hepatic SOD and LDH, and level of hepatic MDA were also determined. Histopathological changes of liver tissue slices stained by HE staining were observed under light microscope. **Results** The activities of ALT, AST and LDH, and level of MDA were significantly decreased by lycopene pretreatment, while activity of SOD in hepatic tissues was markedly increased. The effects of lycopene were close to those of biphenyldicarboxylate. Histopathological results also showed the obvious improvement of liver injury in lycopene pretreatment group. **Conclusion** Lycopene has protective effects against CCl<sub>4</sub>-induced acute hepatic injury in mice, and the mechanisms might be associated with its anti-oxidative activity.

**Key words:** lycopene; acute hepatic injury; protective effects; mice

肝脏是人体重要的生物转化器官, 也是毒物和药物排出体外前重要的清除器官, 因此, 极易受到毒性作用发生肝损伤<sup>[1]</sup>。肝损伤是多因素参与的一个复杂病理过程, 自由基及启动的脂质过氧化连锁

反应是其主要机制之一<sup>[2]</sup>。番茄红素是一种来自于番茄及其制品的类胡萝卜素, 也是存在于人体血浆和组织中最主要的类胡萝卜素<sup>[3]</sup>。已有研究表明, 番茄红素具有抗炎、抗氧化、抗衰老和预防癌症等

收稿日期: 2012-12-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173638, 81102835, 81001682)

作者简介: 张楠楠 (1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药理研究。Tel: (022)23504933 E-mail: zhangnannan1225@163.com

\*通信作者: 高洁 E-mail: gaojie@nankai.edu.cn

多种生物学效应<sup>[4-5]</sup>。其中,强大的抗氧化功能得到了更多的关注,推测番茄红素可能对肝损伤有保护作用。本研究采用四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)诱导的小鼠急性肝损伤模型,采用番茄红素对模型进行干预,旨在探讨番茄红素是否对 CCl<sub>4</sub> 所致的脂质过氧化反应引起的小鼠急性肝损伤有保护作用及其可能的作用机制。

## 1 材料

番茄红素(质量分数>98%,天津尖峰天然产物研究开发有限公司);谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、超氧化歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;BCA 蛋白检测试剂盒(美国 Thermo 公司);HE 染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);联苯双酯滴丸(1.5 mg/丸,100 丸/瓶,北京协和药厂);其他试剂均为市售分析纯。

UV-1800 紫外分光光度计(日本岛津);HWS24X 型电热恒温水浴箱和 DHP-9162 型电热恒温培养箱(上海一恒科技有限公司);AB104-N 电子天平(瑞士 Mettler-toledo 公司);倒置生物相差显微镜(重庆奥特光学仪器公司)。

清洁级昆明种小鼠 40 只,雄性,体质量(20±2) g,军事医学科学院实验动物中心提供,动物合格证书:SCXK-(军)2007-004。

## 2 实验方法

### 2.1 小鼠分组和处理

昆明种小鼠 40 只,适应性喂养 1 d,随机分为 4 组,每组 10 只,分别为正常组、模型组、阳性药联苯双酯组(每天 ig 剂量为 100 mg/kg)、番茄红素组(每天 ig 剂量为 100 mg/kg)。将药物以 0.1% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶解,正常组与模型组以 0.1% CMC-Na ig,每天一次,连续给药 7 d。末次给药 1 h 后,正常组按 0.01 mL/g 的剂量 ip 生理盐水,其余组按 0.01 mL/g 剂量 ip 0.1% 的 CCl<sub>4</sub> 油溶液造小鼠急性肝损伤模型。所有小鼠禁食不禁水,16 h 后称体质量,摘眼球取血后处死小鼠,迅速取出肝脏备检。

### 2.2 生化指标检测

取出的血液在 37 °C 静置 1 h,4 °C 离心(3 500 r/min,10 min)分离血清,按试剂盒说明检测血清中 ALT 和 AST 活力。肝脏于预冷生理盐水中漂洗,除去血液,滤纸拭干,称定质量并计算肝脏指数。取肝脏左叶相同部位称定质重,加预冷生理盐水,

用匀浆机在冰浴中制备成 10% 的肝匀浆,4 °C 离心(6 000 r/min,10 min),分离上清,测肝组织匀浆中丙二醛(MDA)含量、超氧化歧化酶(SOD)活力,乳酸脱氢酶(LDH)活力,具体操作按照试剂盒说明书进行。

肝脏指数=肝脏质量/体质量

### 2.3 肝组织病理切片制作

取小鼠右叶相同位置肝组织,用预冷生理盐水漂洗,滤纸拭干,10%福尔马林固定,石蜡包埋,切片,苏木素-伊红(HE)染色,显微镜下观察各组小鼠肝脏组织病理学变化并拍照。

### 2.4 统计学处理

应用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,多组数据比较采用单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 番茄红素对 CCl<sub>4</sub> 致急性肝损伤小鼠体质量和肝脏指数的影响

实验结果显示,各组小鼠体质量差异无显著性。CCl<sub>4</sub> 模型组较正常组肝脏指数显著增加( $P<0.01$ ),表明 CCl<sub>4</sub> 能够引起小鼠肝脏明显肿大。与 CCl<sub>4</sub> 模型组比较,联苯双酯组与番茄红素组小鼠肝脏指数均显著降低( $P<0.05$ ),且各给药组肝脏指数与正常对照组比较差异无显著性。番茄红素组与联苯双酯组比较,体质量和肝脏指数差异均没有显著性,见表 1。

表 1 番茄红素对 CCl<sub>4</sub> 致急性肝损伤小鼠体质量和肝脏指数影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 1 Effects of lycopene on body weight and liver indices of mice with CCl<sub>4</sub>-induced hepatic injury ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	肝脏指数/%	体质量/g
正常	3.72±0.05	24.69±0.55
模型	4.19±0.04 <sup>△△</sup>	24.53±0.44
联苯双酯	3.88±0.05*	23.84±0.72
番茄红素	3.85±0.10*	25.38±0.35

与正常组比较: <sup>△△</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较: \* $P<0.05$

<sup>△△</sup> $P<0.01$  vs control group; \* $P<0.05$  vs model group

### 3.2 番茄红素对 CCl<sub>4</sub> 致急性肝损伤小鼠血清 ALT、AST 的影响

模型组较正常组血清 ALT 和 AST 活力显著升高( $P<0.01$ ),表明造模成功。与 CCl<sub>4</sub> 模型组比较,联苯双酯组和番茄红素组血清 ALT 和 AST 活力均显著降低( $P<0.01$ )。番茄红素组血清 ALT 和 AST 活力与联苯双酯组比较,差异均无显著性,见表 2。

表 2 番茄红素对 CCl<sub>4</sub> 致急性肝损伤小鼠血清 ALT、AST 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 2 Effects of lycopene on ALT and AST activities in serum of mice with CCl<sub>4</sub>-induced hepatic injury ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	ALT/(U·L <sup>-1</sup> )	AST/(U·L <sup>-1</sup> )
正常组	31.44 ± 1.98	45.19 ± 1.45
模型组	155.50 ± 6.05 <sup>△△</sup>	118.9 ± 4.02 <sup>△△</sup>
联苯双酯	40.24 ± 2.58 <sup>**</sup>	67.57 ± 2.01 <sup>**</sup>
番茄红素	55.65 ± 1.90 <sup>**</sup>	72.64 ± 1.28 <sup>**</sup>

与正常组比较: <sup>△△</sup>*P*<0.01; 与模型组比较: <sup>\*\*</sup>*P*<0.01

<sup>△△</sup>*P*<0.01 vs control group; <sup>\*\*</sup>*P*<0.01 vs model group

### 3.3 番茄红素对 CCl<sub>4</sub> 致急性肝损伤小鼠肝匀浆 SOD、MDA、LDH 的影响

模型组较正常组小鼠肝脏 SOD 活力显著降低 (*P*<0.01), MDA 含量显著升高 (*P*<0.01), LDH 活力显著升高 (*P*<0.01), 表明造模成功。与 CCl<sub>4</sub> 模型组比较, 番茄红素组小鼠肝脏 SOD 活力显著升高 (*P*<0.01), MDA 含量显著降低 (*P*<0.05 或 *P*<0.01), LDH 活力显著降低 (*P*<0.01), 见表 3。

表 3 番茄红素对 CCl<sub>4</sub> 致急性肝损伤小鼠肝组织 SOD、MDA、LDH 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 3 Effects of lycopene on MDA levels, SOD and LDH activities in hepatic tissues of mice with CCl<sub>4</sub> induced hepatic injury ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	SOD/(U·mg <sup>-1</sup> )	MDA/(nmol·mg <sup>-1</sup> )	LDH/(U·g <sup>-1</sup> )
正常	320.5 ± 6.34	0.64 ± 0.02	4 736 ± 264.5
模型	225.6 ± 18.77 <sup>△△</sup>	1.11 ± 0.08 <sup>△△</sup>	8 997 ± 392.1 <sup>△△</sup>
联苯双酯	323.8 ± 11.88 <sup>**</sup>	0.75 ± 0.04 <sup>**</sup>	3 955 ± 297.5 <sup>**</sup>
番茄红素	319.8 ± 9.12 <sup>**</sup>	0.85 ± 0.04 <sup>*</sup>	4 762 ± 496.9 <sup>**</sup>

与正常组比较: <sup>△△</sup>*P*<0.01; 与模型组比较: <sup>\*</sup>*P*<0.05, <sup>\*\*</sup>*P*<0.01

<sup>△△</sup>*P*<0.01 vs control group; <sup>\*</sup>*P*<0.05, <sup>\*\*</sup>*P*<0.01 vs model group

### 3.4 小鼠肝组织病理切片观察

显微镜观察见图 1, 正常组肝小叶结构完整, 肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列, 大小均匀, 无变性、坏死等病理改变, 肝索排列整齐, 无炎症细胞浸润。CCl<sub>4</sub> 模型组肝小叶结构被破坏, 肝索排列紊乱, 肝细胞呈不同程度肿胀, 水样变性, 伴有灶性坏死, 炎症细胞广泛浸润; 番茄红素组和联苯双酯组肝小叶破坏程度和肝细胞水肿变性明显减轻, 坏死明显减少, 片状坏死消失, 中央静脉扩张充血明显减轻, 肝小叶结构清楚, 肝细胞排列较整齐, 有少许细胞胞浆疏松, 汇管区可见少量炎细胞

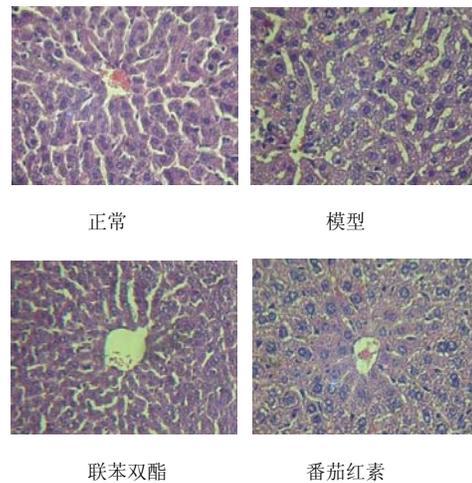


图 1 小鼠肝脏病理切片图

Fig. 1 Pathological slices of hepatic tissue in mice

浸润, 肝组织炎症明显改善。表明番茄红素对 CCl<sub>4</sub> 致小鼠急性肝损伤具有很好的保护作用, 能明显减轻 CCl<sub>4</sub> 对肝脏的病理损伤。

### 4 讨论

各种有害因素引起的肝损伤都会导致肝细胞坏死和凋亡, 而这又引发后续的炎症和纤维化病变<sup>[6]</sup>, 表现为肝坏死、脂肪肝、胆汁淤积、肝纤维化、肝硬化及肝癌等严重威胁人类健康的病变, 因此目前对肝损伤的防治成为一个全球性的严峻课题。CCl<sub>4</sub> 诱导的急性肝损伤模型是最经典的肝损伤模型, 被广泛应用于肝损伤及再生的机制研究<sup>[7-8]</sup>。CCl<sub>4</sub> 诱导急性肝损伤的机制主要与 CCl<sub>4</sub> 进入体内后, 生成活泼的三氯甲基自由基 (·CCl<sub>3</sub>) 和氯自由基 (·Cl) 有关, 因这些自由基可使细胞膜脂质过氧化, 胞浆 Ca<sup>2+</sup> 浓度升高, 从而导致肝细胞损伤<sup>[9-10]</sup>。而 ALT 和 AST 存在于正常肝细胞内, 肝细胞受损破裂时外排入血液; LDH 是一种糖酵解酶, 它存在于机体所有组织细胞的胞质内, 其活力能反映全身多种脏器疾病<sup>[11]</sup>, 这三者是常用的反映肝实质损害的酶学指标。本研究结果显示, 番茄红素给药后能显著降低急性肝损伤模型升高的肝脏指数, 且番茄红素预给药组小鼠血清中 ALT 和 AST 及肝脏组织中 LDH 的活性显著降低, 效果与阳性药联苯双酯接近。番茄红素不仅能改善急性肝损伤模型的酶学指标, 还能够有效降低肝脏的病理损伤程度, 表明番茄红素具有减轻 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝损伤, 可能与其抗氧化活性作用具有潜在的关系。

氧化应激是由于自由基生成与清除系统的平衡状态被破坏而导致的自由基及其代谢产物蓄积, 从

而引发后续的多重毒性作用。SOD 是一种金属蛋白酶, 是生物体内重要的活性氧自由基清除剂, 可阻断活性氧自由基对机体的进一步损伤, SOD 活性反映机体清除活性氧自由基的能力<sup>[12-13]</sup>。MDA 是细胞膜多价不饱和脂肪酸过氧化反应的终产物<sup>[14]</sup>, 其含量直接反映脂质过氧化的速率和强度, 并与活性氧自由基浓度呈正相关。本实验中, 番茄红素能够显著增加小鼠肝脏组织中的 SOD 活性且能显著降低 MDA 含量, 改善了体内自由基生成系统和清除系统的平衡状态, 推测其可能通过抗脂质过氧化反应而产生较好的肝脏保护作用。

综上所述, 番茄红素具有保肝和对抗急性肝损伤的作用, 其机制可能与番茄红素所具有抗脂质过氧化和清除体内过多的氧自由基的作用有关, 为临床应用番茄红素治疗急性肝损伤提供了依据。

#### 参考文献

- [1] Navarro V J, Senior J R. Drug-related hepatotoxicity [J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(7): 731-739.
- [2] Wu K C, Liu J, Klaassen C D. Role of Nrf2 in preventing ethanol-induced oxidative stress and lipid accumulation [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 262(3): 321-329.
- [3] Rao A V, Rao L G. Carotenoids and human health [J]. *Pharmacol Res*, 2007, 55(3): 207-216.
- [4] Burton-Freeman B, Talbot J, Park E, et al. Protective activity of processed tomato products on postprandial oxidation and inflammation: a clinical trial in healthy weight men and women [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2012, 56(4): 622-631.
- [5] Llic D, Misso M. Lycopene for the prevention and treatment of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: a systematic review [J]. *Maturitas*, 2012, 72(4): 269-276.
- [6] Cohen-Naftaly M, Friedman S L. Current status of novel antifibrotic therapies in patients with chronic liver disease [J]. *Therap Adv Gastroenterol*, 2011, 4(6): 391-417.
- [7] Weber L W, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model [J]. *Crit Rev Toxicol*, 2003, 33(2): 105-136.
- [8] 李洪忠, 万敬员, 张 力, 等. 羟基积雪草苷对小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. *中草药*, 2008, 39(10): 1525-1527.
- [9] 裴凌鹏, 崔 箭. 番茄红素对小鼠急性酒精肝损伤的实验研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2009, 36(2): 293-295.
- [10] 齐艳萍, 李和平. 急性肝损伤动物模型制备的概述 [J]. *甘肃畜牧兽医*, 2008, 38(2): 37-39.
- [11] Park C M, Cha Y S, Youn H J, et al. Amelioration of oxidative stress by dandelion extract through CYP2E1 suppression against acute liver injury induced by carbon tetrachloride in Sprague-Dawley rats [J]. *Phytother Res*, 2010, 24: 1347-1353.
- [12] Pawlak K, Pawlak D, Mysliwiec M. Hepatitis intensified oxidative stress, MIP-1 beta and RANTES plasma levels in uraemic patients [J]. *Cytokine*, 2004, 28(6): 197-204.
- [13] Kelly M C, Whitaker G, White B, et al. Nickel(II)-catalysed oxidative guanine and DNA damage beyond 8-oxoguanine [J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 42(11): 1680-1689.
- [14] Wang L, Albrecht M A, Wurtman R J. Dietary supplementation with uridine-5'-monophosphate (UMP), amembrane phosphatide precursor, increases acetylcholine level and release in striatum of aged rat [J]. *Brain Res*, 2007, 1133(1): 42-48.