

柑橘黄酮对小鼠非酒精性脂肪肝保护作用的实验研究

唐星宇¹ 周璐¹ 班源¹ 陈永欣^{2*}

(1. 广西中医药大学瑞康临床医学院, 广西 南宁 530001;

2. 广西中医药大学基础医学院, 广西 南宁 530021)

【摘要】目的: 探讨柑橘黄酮对小鼠非酒精性肝脏损伤的保护作用。方法: 将60只KM小鼠随机分为6组, 分别为正常对照组、模型对照组、阳性对照组(水飞蓟宾注射剂组30mg/kg)、柑橘黄酮(CF)高(50mg/kg)、中(25mg/kg)、低剂量(12.5mg/kg)组。正常对照组使用普通饲料喂养, 其余组使用高脂饲料喂养12周, 造模最后1周联合腹腔注射地塞米松诱导非酒精性脂肪肝(NAFLD)动物模型。造模成功后, 正常对照组和模型对照组灌胃生理盐水, 各给药组灌胃等量相应剂量的柑橘黄酮(CF)对小鼠进行干预, 给药共21d。给药结束后, 摘取小鼠眼球取全血并剖取小鼠肝脏, 检测并观察各组小鼠肝脏损伤的病理学变化、血清学检测和炎症因子检测水平。结果: 经过药物治疗, 阳性对照组和各剂量CF组小鼠的肝组织脂滴空泡数量、脂肪变性均出现了减轻。对比模型组, 低、中、高剂量CF组小鼠血清总胆固醇(TC)、总甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、白细胞介素-6(IL-6)水平均显著降低, 高密度脂蛋白(HDL)水平明显升高。阳性药和各剂量CF组的炎细胞较模型组明显减少。结论: 柑橘黄酮能改善小鼠非酒精性肝脏损伤的程度, 具有一定的保护作用。

【关键词】 柑橘黄酮; 非酒精性脂肪肝; 脂质代谢; 炎症反应

引言

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是指除外长期大量饮酒和其他明确损肝因素^[1]造成的以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变性和脂肪蓄积为病理特征的临床综合征。目前, 以饮食为首因的脂肪肝已成为我国仅次于病毒性肝炎的第二大肝病, 严重危害人民健康^[2], 其发病机制主要与二次打击学说及多重打击学说、胰岛素抵抗、肠道菌群失衡和遗传因素等有关, 可引起脂质代谢紊乱、炎症反应等损害, 其治疗应综合考虑多方面的发病因素, 采取多靶点多途径的治疗措施^[3]。还有研究表明, 罹患NAFLD可增加发生心血管疾病的风险, 对NAFLD的防治有助于减缓心血管疾病的发生发展, 降低心血管疾病的发生率, 所以NAFLD的预防和治疗将显得尤为重要^[4]。柑橘黄酮(CF)可从水果柑橘中提取, 提取方法多样, 随着提取工艺的进步, 其利用价值得到了明显的提高^[5], 更因其所具有的降血脂、抗炎等药理效应对脂肪肝有缓解作用, 故对NAFLD的预防和治疗上有较大价值。目前对CF和NAFLD的研究已经较多, 但CF防治NAFLD的确切机制仍有待研究。本研究旨在为寻预防和治理NAFLD有效方法提供实验依据。

一、材料与仪器

(一) 使用动物

实验采用60只SPF级雄性KM小鼠, 8w龄, 体重(20±2)g, 小鼠由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 动物合格证号: SCXK(湘)2016-0002, 控制温度(25±2)℃左右, 相对湿度45℃左右, 明暗周期为12h。本研究涉及的所有小鼠的所有研究程序均符合动物实验伦理要求。

(二) 药物与试剂

柑橘黄酮: 陕西昂盛生物医药科技有限公司; 水飞蓟宾胶囊: 天津天士力圣特制药有限公司; 地塞米松注射剂: 遂成药业股份有限公司; 1.25%阿佛丁: 购于南京爱贝生物科技有限公司; 60%脂肪比高脂饲料(纯化型): 北京博爱港生物技术有限公司; 胆固醇(TC)、甘油三酯(TG): 购自北京诚林生物科技有限公司; TNF-α: 购于abcam公司。

(三) 主要仪器

冷冻离心机: Thermo Fisher 赛默飞公司; 全自动酶标仪(MuLTISKAN GO): Thermo Fisher 赛默飞公司。

二、方法

(一) 动物分组、造模及给药

将60只KM小鼠适应实验一周后, 随机分为正常

对照组（10只）和造模组（50只），每日对照组给予普通饲料，造模组喂食高脂饲料，饲养12周诱导非酒精性脂肪肝（NAFLD）动物模型^[3]。造模最后一周，使用地塞米松联合高脂饲料造模，正常对照组KM小鼠每只给予腹腔注射生理盐水，其余组每只给予腹腔注射地塞米松，高脂饲料足量饲喂。造模成功后，将造模组随机分为模型对照组、水飞蓟宾阳性组（30mg/kg）、柑橘黄酮高剂量组（50mg/kg）、中剂量组（25mg/kg）、低剂量组（12.5mg/kg），每组10只。造模后给药，每天灌胃给药，对照组和模型组给予等体积生理盐水，1次/d，所有给药共持续21d。

（二）样本的处理和采集

小鼠静脉注射1.25%阿佛丁麻醉后，用已消毒的镊子摘取小鼠眼球取全血滴入含有EDTA抗凝剂的离心管内，静置30min后用5000r/min离心，取上清液，即为待测标本，取血后小鼠颈椎脱臼处死，再在冰上取各组小鼠肝脏组织，清洗、擦干、称重记录后将肝脏切成若干份于多聚甲醛中固定，分别编号存入冰箱中，以待后续检测。

（三）HE病理染色

取各组小鼠肝脏同一部位的肝组织样本，用10%福尔马林溶液固定，然后进行浸洗、脱水、石蜡包埋和切片，制成石蜡切片。切片用二甲苯除去石蜡、各级乙醇和蒸馏水冲洗，将切片放入苏木精染色液中染色5-10分钟，0.5%盐酸乙醇分化数秒，然后用自来水冲洗并浸泡在伊红染色液中染色2-3分钟，洗去浮色后再用各级乙醇脱水、二甲苯透明标本，进行封固，最后在光学显微镜下观察小鼠肝组织情况以及脂滴的分布及变化情况。

（四）肝脏油红O染色

取各组小鼠肝脏样本于冰冻切片机在-18℃下进行冰冻切片，取切片于4%多聚甲醛中固定30min后脱水，用油红O染色液染色30min，随后用二甲苯洗涤液洗涤，使用中性的树脂进行封片，最后在镜下观察小鼠肝组织中脂滴的分布情况。

（五）血清学检测

取待测标本，按照试剂盒步骤检测肝组织中总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）、低密度脂蛋白（LDL）、高密度脂蛋白（HDL）、白细胞介素-6（IL-6）的含量。

（六）炎症因子检测

取各组小鼠肝脏样本，用10%福尔马林溶液固定，浸洗、脱水、石蜡包埋和切片后制成石蜡切片，

进行免疫组化（IHC）检测肝组织肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）的含量。

三、结果

（一）柑橘黄酮对肝组织病理变化的影响

根据实验结果显示，HE染色后，正常对照组小鼠肝组织结构清晰，未见明显脂肪空泡；模型对照组肝脏组织出现弥漫性脂肪变，见有大量大小不等的脂肪空泡和气球样变；油红O染色后，正常对照组小鼠肝组织呈现大量蓝色，模型对照组肝脏组织有大量的红色脂滴。经过药物治疗后，肝组织镜下见HE染色的阳性对照组和各剂量CF组肝组织内脂肪空泡和气球样变均减少，油红O染色的阳性对照组和各剂量CF组红色脂滴均减少。两种染色均可见治疗后的肝组织内脂滴空泡数量、脂肪变性减少、减轻，说明CF对小鼠肝脏组织脂肪变性、脂质堆积有减轻作用。

（二）柑橘黄酮对小鼠血清TC、TG、LDL、HDL和IL-6的影响

对比正常组，模型组小鼠血清TC、TG、LDL和IL-6水平均明显升高，HDL水平明显下降，对比模型组，低、中、高剂量CF组小鼠血清TC、TG、LDL和IL-6水平均显著降低，HDL水平显著升高。

（三）柑橘黄酮对炎症因子的影响

免疫组化结果显示，与正常组相比，模型组中有明显的炎细胞浸润，提示存在较强炎症反应，而阳性药和各剂量CF组的炎细胞较模型组明显减少，可见TNF- α 水平得到明显控制。

四、讨论

柑橘黄酮是柑橘中的活性成分，其生物学作用多，活性强，研究显示其具有改善糖脂代谢、抗动脉粥样硬化、心血管保护、抗氧化、抗炎、抗肿瘤、调节生物节律等作用^[4]。近年有研究表明，橙皮素（HES）与柚皮素（NAR）两种柑橘类黄酮都可调节NAFLD小鼠肝脏脂质代谢，并通过不同的侧重发挥对NAFLD的保护作用，HES侧重改善血脂紊乱与肠道通透性升高，NAR则侧重改善附睾脂肪生成与肝脏炎症^[5]。柑橘皮发酵液提取物具有良好的DPPH及羟自由基清除能力和降脂作用，对NAFLD的防治方面具有良好的潜在价值，而且柑橘皮发酵液提取物中含有的柑橘黄酮类物质能有效降低细胞内TG含量，这种降低细胞内TG含量的效果随着给药剂量浓度的增加而增强^[6]，此外，还有研究表明多甲氧基黄酮饼干能够降低高脂小鼠的TG和LDL-C水

平和 Lee's 指数, 具有降低血脂保护肝脏的作用^[7]。以上研究都从降血脂、抗炎等不同方向揭示了 CF 对脂肪肝的防治作用。本研究旨在, 为寻预防和治理 NAFLD 有效方法提供实验依据。

在冯钟文等人的实验中, 使用腹腔注射地塞米松联合高脂饲料诱导 NAFLD 模型, NAFLD 小鼠模型造模成功后, 小鼠血清中 TG、TC、LDL 等水平显著升高, HDL 水平显著降低, 肝内出现脂肪变及炎症反应^[11]。在本实验中, 同样使用地塞米松和高脂饲料诱导造模。经检测发现正常对照组中小鼠肝组织结构清晰, 未见明显脂肪空泡, 而模型对照组小鼠肝组织 HE 染色和油红 O 染色均显示明显的脂滴空泡和脂肪变性, 血清学检查显示 TC、TG、LDL 水平明显升高, HDL 水平明显降低, 说明模型对照组小鼠脂质代谢出现明显紊乱。经过不同剂量的 CF 治疗后, 各治疗组小鼠脂滴空泡和脂肪变性均明显减少, 血清 TC、TG、LDL 水平减低, HDL 水平升高, 其结果与阳性对照组相似, 说明 CF 能改善 NAFLD 小鼠脂质代谢紊乱, 对 NAFLD 小鼠脂肪变性、脂质堆积有减轻作用。此外在炎症反应上, 正常对照组未出现明显的炎症反应, 模型对照组小鼠血清 IL-6 水平明显升高, 免疫组化结果显示肝组织内有明显的炎细胞浸润, 出现明显的炎症反应, 说明 NAFLD 还与肝组织内的炎症反应有关, 而治疗后的阳性对照组和各剂量 CF 组的炎细胞较模型组明显减少, 可见 TNF- α 水平得到明显控制, 说明 CF 可能通过减少 NAFLD 中炎细胞浸润, 控制 TNF- α 水平, 从而起到保护肝脏组织的作用。

综上所述, 柑橘黄酮对 NAFLD 具有保护作用, 其保护作用可能与减轻 NAFLD 中脂肪变性、脂质堆积, 降低血清 TC、TG、LDL、IL-6 水平, 升高血清 HDL 水平, 改善脂质代谢紊乱, 控制炎症反应有关, 但其作用效果与剂量的关系仍待进一步研究。此外, 针对 NAFLD 患者的预防和治疗, 除了使用 CF 等药物进行防治外, 还可注重运动训练和精神心理方面的干预, 这样有望在 NAFLD 的防治上取得更大的成效。本实验为进一步全面深入地研究柑橘黄酮作为防治 NAFLD 的新药和临床应用奠定了一定的实验基础和提供理论依据。

参考文献:

[1] 郭亮, 汤其群. 非酒精性脂肪肝发病机制和治疗的研究进展 [J]. 生命科学, 2018, 30(11): 1165-1172.

[2] 张磊, 吕文. 非酒精性脂肪肝诊疗新进展 [J]. 当代医学, 2019, 25(16): 191.

[3] 叶子昊, 祝可欣, 贺宇涵等. 非酒精性脂肪肝的发病机制及潜在药物研究进展 [J]. 河北医药, 2023, 45(22): 3484-3488.

[4] 倪雪桐, 王若羲, 张晶等. 非酒精性脂肪性肝病、代谢相关脂肪性肝病与心血管疾病关联的国内外研究进展 [J/OL]. 中国全科医学, 1-6[2023-12-09]http://kns.cnki.net/kcms/detail/13.1222.R.20230922.1542.006.html.

[5] 叶沛铭, 梁雅慧, 吴颖妍等. 柑橘水果中黄酮类物质的提取方法生物活性及应用研究进展 [J]. 农产品加工, 2023, (15): 78-80+85.

[6] Emamat H, Foroughi F, Eini-Zinab H, et al. The Effects of Onion Consumption on Prevention of Nonalcoholic Fatty Liver Disease [J]. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2017: 1-6.

[7] 田德丽. 柑橘黄酮的生物学作用研究进展 [J]. 云南医药, 2022, 43(6): 95-97.

[8] 葛晶晶. 基于肠道菌群和肝脏代谢组学研究柑橘类黄酮对非酒精性脂肪肝病的保护作用 [D]. 南昌大学, 2022.

[9] 崔欣悦, 王雨辰, 凌空等. 柑橘皮发酵液抗氧化活性及对油酸诱导 HepG2 细胞脂肪堆积的影响 [J]. 食品科技, 2019, 44(06): 25-29.

[10] 李淑珍, 杨巍巍, 康爱娟等. 柑橘多甲氧基黄酮饼干对高血症小鼠的降脂效应 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(01): 63-70.

[11] 冯钟文, 庞丽君, 陈思韵等. 香蜂草苷对地塞米松诱导 C57BL/6J 小鼠非酒精性脂肪肝的保护作用及其机制 [J]. 中药材, 2021, 44(04): 961-965.

基金项目: 广西自然科学基金项目青年科学基金项目 (2020GXNSFBA159043); 广西中医药大学 2019 ~ 2021 年广西一流学科建设开放课题项目 (2019XK083); 2021 年自治区级大学生创新创业训练计划项目 (S202110600087)

作者简介: 唐星宇, 男, 在读本科生, 研究方向: 中医药防治肝病的基础研究;

通讯作者: 陈永欣, 女, 副教授, 研究方向: 中医药防治肝病的基础研究。