

海狗油对实验性脂肪肝脂代谢和血栓素 A₂ 及丙二醛的影响

李湛军, 刘建文, 徐康森

中国药品生物制品检定所生化药品与基因工程药物室, 北京 100050

摘要 目的: 探讨海狗油抑制脂肪肝的作用机理。
方法: 小剂量四氯化碳合并高脂饲料复制大鼠脂肪肝模型 7 周后, 模型组灌胃 (ig) 给予等体积橄榄油; 辛伐他汀组给予辛伐他汀 4 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 海狗油低、中、高剂量组 ig 海狗油 0.5、1.6、4.8 g·kg⁻¹·d⁻¹, 连续 8 周, 正常大鼠作为空白组。测定肝脂、肝内前列环素的代谢产物(6-keto-PGF_{1α})与血栓素 A₂ 的代谢产物(TXB₂)含量, 观察脂质过氧化作用和组织学检查结果。**结果:** 海狗油各组肝细胞内 TXB₂ 含量降低, 6-keto-PGF_{1α}/TXB₂ 比值增加, 超氧化物歧化酶(SOD)活性升高, 甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、丙二醛(MDA)、游离脂肪酸(FFA)含量显著降低, 组织学检查显示肝内脂变减轻, 细胞色素 P₄₅₀ 2E1(CYP2E1)免疫组织化学染色显色指数减小。**结论:** 海狗油使实验性脂肪肝的肝脂和肝内血栓素 A₂ 的代谢产物减少, 即抑制肝脂合成、促进肝脂代谢(直接作用); 使肝内血液粘度减少、血液流动性增加(间接作用), 从而对实验性脂肪肝有抑制作用; 同时海狗油使 MDA 含量降低、SOD 活性升高而有抗氧化作用。

关键词 海狗油; 脂肪肝; 肝脂; 血栓素 A₂; 前列环素; 丙二醛

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 1009-2501(2005)05-0518-04

海狗油富含二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳五烯酸(DPA)和二十二碳六烯酸(DHA)等ω-3多不饱和脂肪酸, 是人体必须脂肪酸, 在体内竞争抑制花生

四烯酸(AA, ω-6二十碳四烯酸)的代谢, 在不同组织细胞中代谢成相应的前列腺素(PGs)、丙二醛(MDA)、血栓素(TXs)、前列环素(PGI)、白三烯(LTs)统称为类二十碳烷酸化合物(eicosanoids), 具有抗血小板的粘附和聚集、舒张血管和抗炎免疫等作用^[1]。本文从海狗油对肝脂和肝内血栓素 A₂ 代谢产物及脂质过氧化反应的终产物 MDA 的影响等方面, 探讨海狗油对实验性脂肪肝的作用机理。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂 海狗油有效成份 EPA、DPA 和 DHA 的含量大于 25%, 由本实验室精制纯化; 辛伐他汀(simvastatin) 50 mg/片肠溶衣片, 杭州默沙东制药有限公司生产。血栓素 B₂(TXB₂)和 6-酮-前列腺素 F_{1α}(6-keto-PGF_{1α}) 放免药盒, 中国人民解放军总医院科技开发中心放免研究所; MDA、游离脂肪酸(FFA)、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒, 北京帮定泰克生物技术有限公司; 总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)检测试剂盒, 北京中生生物工程高技术公司。
1.2 动物 Wistar 大鼠, SPF 级, 体重 130~150 g, ♂, 动物合格证号: 京动许字(2000)第 017 号, 由中国药品生物制品检定所实验动物中心提供。动物实验室为二级。

1.3 仪器 日立 U-3310 紫外可见分光光度计; BECKMAN GS-15R 低温离心机; OLYMPUS-BX51 生物显微镜; SN-695B 智能放免 γ 测量仪, 上海核所日环光电仪器有限公司。

1.4 大鼠脂肪肝模型建立及分组给药 除 10 只大鼠作为空白组(始终喂基础饲料)外, 其余大鼠于试验 d 1 后肢内侧皮下一次性注射 40% 四氯化碳的橄榄油溶液 3 ml·kg⁻¹, 并饲以高脂饲料^[2](脂肪 20%, 胆固醇 1%, 脱氧胆酸钠 0.2%, 丙硫氧嘧啶 0.2%, 基础饲料 78.6%)。7 周后, 脂肪肝大鼠(解剖 2 只大鼠, 病理检查模型成立)按体重随机分为模型组、

2005-03-10 收稿 2005-04-16 修回

李湛军, 通讯作者, 女, 医学博士, 副主任药师, 研究方向: 生化药理与生物检定。

Tel: 010-67017755-464 E-mail: zhanjunq@yahoo.com.cn

辛伐他汀 4 mg·kg⁻¹·d⁻¹组、海狗油 0.5、1.6 和 4.8 g·kg⁻¹·d⁻¹组, 每组 10 只, 每组分别 ig 等体积橄榄油、辛伐他汀^[3] 4 mg·kg⁻¹·d⁻¹、海狗油 0.5、1.6 和 4.8 g·kg⁻¹·d⁻¹, 连续 8 周。

1.5 血清 MDA 和 SOD 的测定^[4] 最后一次给药后大鼠隔夜禁食, 股动脉放血处死取血, 分离血清, 按试剂盒要求, MDA 用硫代巴比妥酸(TBA) 比色法、SOD 用黄嘌呤氧化酶法, 测定 MDA 含量及 SOD 活力。

1.6 肝脏生化指标的测定^[5] 大鼠处死后迅速剖腹取肝, 用滤纸滤干血水, 每只取相同部位肝组织 100 mg, 4 ℃ 下制备 2% 异丙醇的肝均浆液, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液按说明书要求测定 TC、TG、MDA。同法取肝组织 200 mg, 4 ℃ 下制备 10% 的生理盐水肝匀浆液, 离心取上清液按说明书要求测定 SOD 和 FFA (酶比色法); 另取上清液 0.5 ml, 负压吹干, 临测时加 0.5 ml 生理盐水复溶, 按试剂盒要求, 用放免法测定 6-keto-PGF_{1α} 和 TXB₂。

1.7 组织学检查 肉眼观察肝脏后, 取肝左叶一半迅速制作冰冻切片、苏丹 III 染色。另一半肝组织常规石蜡包埋切片, CYP2E1 免疫组织化学染色, 于光学显微镜下观察结果^[6], 并以生物图像分析系统软件(北京清大德人科技有限公司) 处理显色结果进行定量分析, 以显色指数表示。

1.8 统计学处理 所有数据均用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用 *t* 检验, 各指标之间的相关性采用两因素的相关分析。

2 结果

2.1 海狗油对大鼠肝脏脂质的影响 模型组大鼠肝脏的 TC、TG 和 FFA 含量较空白组增加 (*P* < 0.01), 而海狗油 0.5、1.6 和 4.8 g·kg⁻¹·d⁻¹ 组 TC、TG 和 FFA 含量较模型组均有显著降低 (*P* < 0.01), 与辛伐他汀组相近 (*P* > 0.05); 比模型组 TC 降低 67% ~ 87%、TG 降低 24% ~ 51%、FFA 降低 1% ~ 24%, 表明海狗油减轻了肝脏的脂变程度(表 1)。

表 1 海狗油对脂肪肝大鼠肝脏的总胆固醇(TC)、甘油三脂(TG)和游离脂肪酸(FFA)的影响($\bar{x} \pm s$, *n* = 10)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	TC /mg·g ⁻¹	TG /mg·g ⁻¹	FFA /nmol·g ⁻¹
空白组	—	3.6±0.9	21.8±6.4	5.4±1.6
模型组	—	73.8±9.0 ^c	233.3±38.2 ^c	13.9±1.4 ^c
海狗油组	0.5	24.5±9.5 ^f	176.8±28.5 ^f	13.7±1.3
海狗油组	1.6	15.1±3.8 ^f	116.8±22.6 ^f	11.0±2.8 ^f
海狗油组	4.8	9.3±1.4 ^f	113.3±37.4 ^f	10.6±1.8 ^f
辛伐他汀组	0.004	8.6±2.3 ^f	94.4±24.7 ^f	11.6±1.2 ^f

与空白组比较^c *P* < 0.01; 与模型组比较^f *P* < 0.01

2.2 海狗油对肝脏 TXB₂ 和 6-keto-PGF_{1α} 的影响 脂肪肝模型组比空白组大鼠肝脏的 6-keto-PGF_{1α} /TXB₂ 比值降低 94% (*P* < 0.01), 而海狗油 4.8 g·kg⁻¹ 组较模型组 TXB₂ 含量降低 67% (*P* < 0.01), 6-keto-PGF_{1α} 含量升高 174% (*P* < 0.01), 6-keto-PGF_{1α} /TXB₂ 比值增加 713% (*P* < 0.01, 表 2), 即

TXA₂ (不稳定而水解为 TXB₂) 含量降低, PGI (不稳定氧化为 6-keto-PGF_{1α}) 含量升高, 表明 TXA₂ 抗血小板的粘附和聚集作用及 PGI 舒张血管的作用增加, 提示海狗油与 AA 竞争抑制其代谢, 使肝的血液流动性增加。

表 2 海狗油对脂肪肝大鼠肝脏的血栓素 B₂(TXB₂) 和 6-酮-前列腺素 F_{1α} (6-keto-PGF_{1α}) 的影响($\bar{x} \pm s$, *n* = 10)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	TXB ₂ /ng·g ⁻¹	6-keto-PGF _{1α} /ng·g ⁻¹	6-keto-PGF _{1α} /TXB ₂
空白组	—	1.2±0.4	9.0±4.4	8.6±5.4
模型组	—	5.0±2.2 ^c	2.3±1.6 ^c	0.5±0.3 ^c
海狗油组	0.5	4.7±1.6	2.6±1.2 ^f	0.6±0.4
海狗油组	1.6	1.5±0.6 ^f	3.6±3.4 ^f	2.0±1.1 ^f
海狗油组	4.8	1.6±0.7 ^f	6.4±5.5 ^f	4.3±3.9 ^f
辛伐他汀组	0.004	2.9±2.0 ^f	6.6±2.5 ^f	3.3±2.3 ^f

与空白组比较^c *P* < 0.01; 与模型组比较^f *P* < 0.01

2.3 海狗油对血清和肝脏脂质氧化作用的影响 模型组血清和肝脏的MDA比空白组均升高($P<0.01$), SOD 活力降低($P<0.01$); 海狗油 0.5、1.6 和 4.8

$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组比模型组肝脏的MDA降低40%~83% ($P<0.01$), SOD 活力升高 35%~102% ($P<0.01$), 表明海狗油有抗氧化、增强 SOD 活力的作用(表 3)。

表 3 海狗油对大鼠血清和肝脏的丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量 $[\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}]$	血清 MDA $[\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}]$	肝脏 MDA $[\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}]$	血清 SOD $[\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}]$	肝脏 SOD $[\text{U}\cdot\text{g}^{-1}]$
空白组	—	10.4±0.7	0.4±0.1	32.4±1.8	211.2±8.3
模型组	—	20.3±2.2 ^c	13.6±2.2 ^c	16.2±1.7 ^c	89.9±27.2 ^c
海狗油组	0.5	19.2±2.4	8.2±1.6 ^f	18.2±3.1	121.1±33.6 ^c
海狗油组	1.6	14.8±2.8 ^f	4.7±1.4 ^f	21.5±4.6 ^f	158.4±22.0 ^f
海狗油组	4.8	14.1±1.1 ^f	2.3±1.1 ^f	22.5±3.7 ^f	181.9±21.1 ^f
辛伐他汀组	0.004	12.4±1.3 ^f	1.1±0.5 ^f	24.2±6.3 ^f	192.5±23.2 ^f

与空白组比较^c $P<0.01$; 与模型组比较^c $P<0.05$, ^f $P<0.01$

2.4 组织学检查 苏丹 II染色与 CYP2E1 免疫组织化学染色结果^[6] 相近: 空白组大鼠苏丹 II染色均为阴性, CYP2E1 染色基本为阴性即肝脏无脂肪变性; 模型组大鼠均为强阳性, 出现肝细胞重度弥漫性脂肪变性; 海狗油各剂量组和辛伐他汀组肝细胞数目减少。以生物图像分析系统定量测定 CYP2E1 表达强度的显色指数, 可清楚地看出模型组显色指数最大, 海狗油 0.5、1.6 和 4.8 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组随剂量增大显色指数逐渐减小, CYP2E1 表达受到抑制(图 1)。

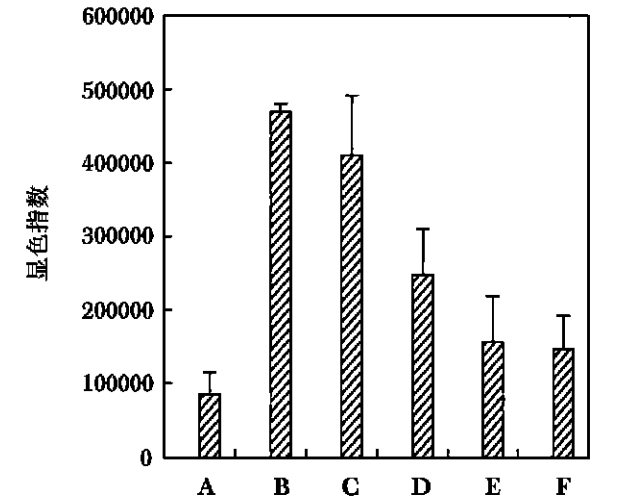


图 1 海狗油对脂肪肝大鼠肝脏组织学检查的 CYP2E1 表达强度的影响
A: 空白组; B: 模型组; C、D、E: 海狗油 0.5、1.6、4.8 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组; F: 辛伐他汀 4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组

2.5 相关性分析 TXB_2 与肝 TC、TG、FFA、CYP2E1 表达的显色指数、血清 MDA 和肝脏 MDA 呈正相关, 与血清 SOD 和肝脏 SOD 呈负相关; 而 6-keto-PGF_{1 α} 与肝脂 TC、TG 和 FFA、CYP2E1 表达的显色指数、血清 MDA 和肝脏 MDA 之间呈负相关, 与血清 SOD 和

肝脏 SOD 呈正相关(图 2)。这进一步提示海狗油具有抑制血小板聚集和舒张血管的作用, 使肝内血液流动增加, 从而促进肝脂代谢, 抗脂质过氧化。

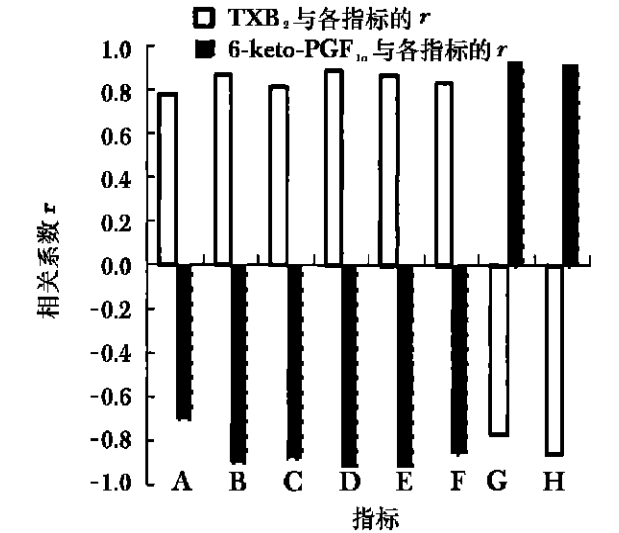


图 2 脂肪肝大鼠 ig 海狗油后肝脏的血栓素 B₂ (TXB_2) 和 6-酮-前列腺素 F_{1 α} (6-keto-PGF_{1 α}) 与各指标间相关性分析 ($n=10$)
A: 总胆固醇; B: 甘油三脂; C: 游离脂肪酸; D: CYP2E1 表达的显色指数; E: 血清 MDA; F: 肝脏 MDA; G: 血清 SOD; H: 肝脏 SOD。

3 讨论

文献报道肝内血液流动减慢, 使肝窦状腺阻塞是造成脂肪肝的原因之一^[7]。EPA(也称为花生五烯酸)已被证实与 AA 竞争抑制其代谢过程, 而抑制血小板聚集和舒张血管, 使肝内血液流动增加^[7], 但海狗油能否具有同效? 本实验证实中、高剂量海狗油使大鼠肝脏 TXB_2 含量显著降低, 6-keto-PGF_{1 α} 值显著增加, 即 AA 代谢产物 TXA_2 降低, PGI 增加, 表明改善了微循环, 降低了血液粘度, 使肝的血液流动性增加, 从而间接降肝脂。

大量氧自由基及脂质过氧化产物的产生, 直接损伤各种生物膜, 氧化细胞膜的蛋白, 导致肝细胞结构与功能的损害, 干扰肝内脂代谢, MDA 也是 AA 的代谢产物之一, 而海狗油与 AA 竞争抑制其代谢过程。本实验证实海狗油使 CYP2E1 表达下调, 肝细胞内 MDA 浓度降低, SOD 活性逐渐升高, 有抗氧化作用, 防止肝细胞的脂肪变性和肝脏损伤, 促进肝内脂代谢。

文献报道海狗油能提高肝脏脂代谢关键酶脂蛋白酯酶和低密度脂蛋白 (LDL) 受体的活性, 促进脂代谢, 抑制 TG 合成限速酶的活性, 减少肝内 TG 的合成, 而直接降肝脂^[8,9]。

本实验证明海狗油可使肝内 TC、TG、FFA 含量下降, 减轻了肝脏脂变程度。

本实验从上述三个方面说明海狗油对脂肪肝抑制作用的机理。海狗油是长链 ω -3 多不饱和脂肪酸的最好来源, 含有其它鱼油没有的 DPA(鱼油只有 EPA 和 DHA), 而 DPA 具有更重要生理活性^[9]。随着人们对某些营养素(如维生素和氨基酸类) 的认识深入, 其研究和应用的更准确, 必将逐渐被当作药品使用, 海狗油也一样, 高浓度有效成分的海狗油申报国家新药已获批准上临床研究, 其应用前景必将

非常可观。

参考文献

- 1 李湛军, 王召, 徐康森. 海狗油 ω -3 脂肪酸的研究进展及作用机制[J]. 药物分析杂志, 2004; 24: 561—6
- 2 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001; 1202—3
- 3 阎明, 吕瑞娟, 贾晓青. 辛伐他汀对高脂血症性脂肪肝治疗的实验[J]. 中华消化杂志, 2002; 22: 223—5
- 4 朱忠勇. 实用医学检验学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1992; 376—8
- 5 张均田. 现代药理实验方法[M]. 第 1 版. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998; 1220—80
- 6 邓莉娟, 李湛军, 乐嘉静, 阎安庄, 徐康森. 海狗油对非酒精性脂肪肝肝细胞色素 P₄₅₀ 2E1 表达及与氧化抗氧化关系的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004; 9: 755—8
- 7 Kurihara T, Adachi Y, Yamagata M. Role of eicosapentaenoic acid in lipid metabolism in the liver, with special reference to experimental fatty liver[J]. Clin Ther, 1994; 16: 830—7
- 8 Kurihara T, Tsuchiya M, Akimoto M. Blood rheological study in rats with fatty liver with special reference to effects of ethyl eicosapentate[J]. Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi, 1997; 94: 328—35
- 9 Delzenne NM, Hernaix NA. Lack of protective effect of menhaden oil supplementation on rat liver steatosis induced by a carbohydrate rich diet[J]. Food Chem Toxicol, 1998; 36: 555—61

Effects of seal oil on liver lipid metabolism and thromboxane A₂ and MDA of experimental fatty liver in rats

LI Zhan-jun, LIU Jian-wen, XU Kang-sen

Department of Biochemical Drug and Genetic Engineering Pharmaceutical, National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China

ABSTRACT **AIM:** To study the inhibition effects of seal oil on fatty liver in rats. **METHODS:** A low dose of carbon tetrachloride and high fat diet chronically feed was given to five groups ($n=10$ in each) of male Wistar rats for 7 weeks to induce the model of fatty liver. Then the five groups were orally administered olive oil, simvastatin $4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, seal oil 0.5, 1.6 or $4.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ for other 8 weeks, respectively. The untreated control group received only normal feed. The liver lipid, production of prostacyclin and thromboxane A₂, lipid superoxidation parameters were measured to compare with the changes. The pathology was evaluated. **RESULTS:** The ratio of 6-keto-PGF_{1 α} /TXB₂ were significantly increased in seal oil group due to decrease TXB₂ and increase 6-keto-PGF_{1 α} in liver when compared with those in olive oil group

(model group) ($P<0.01$). Liver TC, TG, FFA and MDA concentrations were significantly decreased in the seal oil groups when compared with those in model group ($P<0.01$), but SOD concentration increased ($P<0.01$). Pathology showed that seal oil markedly improved fatty liver and the reduction of index analyzed from CYP2E1 express ($P<0.01$). **CONCLUSION:** Seal oil inhibits fatty changes of the liver by both direct effects of inhibition the synthesis of liver lipid and modulating lipid metabolism and indirect effects of increase the hepatic blood flow due to decrease the TXA₂ concentration and blood viscosity. In addition, seal oil shows anti-lipid superoxidation by decreasing MDA concentration.

KEY WORDS seal oil; fatty liver; liver lipid; TXA₂; PGI; MDA