

橄榄苦苷对脂多糖诱导的小鼠急性肝损伤的保护效应*

胡光强¹,袁 园¹,杜 曦¹,李永杰²,余 录^{1△}

(西南医科大学:1.基础医学院;2.药物与功能性食品研究中心,四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 观察橄榄苦苷对脂多糖(LPS)诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用。**方法** 雄性 ICR 小鼠被分为正常对照组、LPS 组、橄榄苦苷低剂量组(15 mg/kg),橄榄苦苷中剂量组(30 mg/kg),橄榄苦苷高剂量组(45 mg/kg)及甘利欣组(甘草酸二铵注射液,11.25 mg/kg)。LPS(10 mg/kg)腹腔注射制作急性肝损伤模型,橄榄苦苷及甘利欣均于 LPS 注射后 1 h 和 3 h 尾静脉给予,正常对照组给予等量的生理盐水。6 h 后处死所有小鼠,用称质量法计算肝脏指数,苏木素-伊红(HE)染色观察肝脏组织病理学变化,免疫组织化学染色法检测肝组织肿瘤坏死因子(TNF- α)及细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的表达。**结果** 肝脏指数:橄榄苦苷高剂量组、中剂量组及甘利欣组较 LPS 组明显降低($P < 0.05$);染色结果:高剂量和中剂量的橄榄苦苷及甘利欣组减轻 LPS 诱导的小鼠肝脏病理学损伤程度。与 LPS 组比较,橄榄苦苷高剂量组、中剂量组及甘利欣组 TNF- α 和 ICAM-1 的表达显著下调($P < 0.05$)。**结论** 橄榄苦苷对 LPS 所致的小鼠急性肝损伤具有显著的保护作用,其机制可能与阻止肝脏炎症反应有关。

[关键词] 橄榄;肝脏;创伤和损伤;急性病;脂多糖类;急性肝损伤;橄榄苦苷

[中图分类号] R575;R966

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)03-0312-03

Protective effects of oleuropein on acute liver injury induced by lipopolysacchide in mice*

Hu Guangqiang¹, Yuan Yuan¹, Du Xi¹, Li Yongjie², Yu Lu^{1△}

(1. College of Basic Medicine; 2. Research Center of Drugs and Functional Foods, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the protective effects of oleuropein on acute liver injury induced by lipopolysacchide(LPS) in mice. **Methods** Male ICR mice were divided into the normal control group, LPS group, oleuropein high dose(45 mg/kg), medium dose (30 mg/kg) and low(15 mg/kg) dose groups and Ganlixin (glycyrrhizic acid diammonium injection, 11.25 mg/kg) group. Mice were intraperitoneally injected with LPS(10 mg/kg) to establish the model of liver injury, then mice were intravenously given oleuropein and Ganlixin by tail vein at 1, 3 h after LPS injection. Subsequently, all mice were sacrificed at 6 h, the liver index was calculated by weighing method, the pathologic changes were observed by HE staining, and the expressions of TNF- α and ICAM-1 were detected by immunohistochemical techniques. **Results** The liver index: compared with the LPS group, the liver index in the oleuropein high and medium doses groups and Ganlixin group were significantly decreased ($P < 0.05$); the staining results: the oleuropein high and medium doses groups and Ganlixin group reduced the liver pathology damage degree induced by LPS; the expression of TNF- α and ICAM-1 in the oleuropein high and medium doses groups and Ganlixin group were significantly down-regulated compared with the LPS group ($P < 0.05$). **Conclusion** Oleuropein has remarkable protective effect on mice acute liver injury induced by LPS, its mechanism may be associated with blocking the liver inflammatory reaction.

[Key words] canarium album; liver; wounds and injuries; acute disease; lipopolysaccharides; acute liver injury; oleuropein

肝脏是人体最大的消化腺,是体内新陈代谢的核心场所,也是内毒素最易致损的靶器官之一。内毒素是革兰阴性细菌细胞壁中的一种成分,其主要成分脂多糖(lipopolysacchide, LPS)在肝脏疾病的发生、发展过程中起着至关重要的作用^[1]。橄榄苦苷,一种在橄榄叶中含量极高并易于分离纯化的生物活性物质,具有消炎、抗病毒、防癌等多种药理学效应^[2]。本实验采用 LPS 腹腔注射致小鼠急性肝脏炎症模型,观察橄榄苦苷的保护作用,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 SPF 级雄性 ICR 小鼠,体质量 25~30 g,购自重庆腾鑫生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂与仪器 橄榄苦苷由成都曼斯特生物科技有限公司提供,纯度:高效液相色谱法(HPLC) $\geq 98\%$;LPS(from Escherichia coli 0111:B4, Sigma 公司);甘利欣注射液购自江苏正大天晴药业股份有限公司;肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)单克隆抗体、链霉亲和素-生物素复合物(SABC)试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。仪器还有梅特勒 LE104E 电子天平(梅特勒托利多,瑞士),奥林巴斯 BX60 显微镜(奥林巴斯,日本),Leica CM 1950 冰冻切片机(徕卡公司,德国)及 Image-pro Plus 6.0 图像分析软件(Media Cybernetics,美国)。

1.2 方 法

1.2.1 实验动物分组及动物模型制作 小鼠分为正常对照

组、LPS 组、橄榄苦苷低剂量组 (15 mg/kg)、橄榄苦苷中剂量组 (30 mg/kg)、橄榄苦苷高剂量组 (45 mg/kg) 及甘利欣组。甘利欣组以 11.25 mg/kg 的剂量给药 (按成人用药量换算成小鼠等效剂量), 每组 13 只。LPS (10 mg/kg) 腹腔注射给予, 橄榄苦苷和甘利欣于 LPS 注射后 1、3 h 尾静脉注射给予, 正常对照组及 LPS 组给予等量生理盐水。

1.2.2 肝脏指数检测 LPS 注射后 6 h, 每组 8 只小鼠麻醉后处死, 取肝脏用滤纸将表面吸干, 电子分析天平称其湿质量, 计算肝脏指数。肝脏指数 = 肝湿质量 / 体质量 × 100%。

1.2.3 组织病理学观察 将小鼠麻醉后, 分别用冰冻磷酸盐缓冲液 (PBS) 和多聚甲醛灌注, 取肝脏右侧中叶同一部位甲醛固定 24 h, 置于 15% 的蔗糖溶液中过夜, 次日标本沉底后, 换 30% 的蔗糖溶液浸泡, 4 °C 冰箱保存, 择日用聚乙二醇和聚乙烯醇的水溶性混合物 (optimal cutting temperature compound, OCT) 包埋、冰冻切片, 用于苏木素-伊红 (HE) 染色和免疫组织化学染色。

1.2.4 HE 染色 切片置于 50 °C 烤箱 4 h, 蒸馏水洗 5 min, 3 次, 然后苏木素染色 2 min, 流水冲洗, 1% 盐酸乙醇分化 1~3 s, 蒸馏水洗 5 min × 3 次, 伊红液染色 1~3 min, 蒸馏水稍洗后 80%、95% 乙醇及无水乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 烤干后封片。400 倍光镜下取肝组织同一区域 3 个不同的视野采图, 观察肝脏病理学改变情况。

1.2.5 免疫组织化学染色 切片用蒸馏水洗 5 min × 3 次, 3% H₂O₂ 甲醇液避光孵育 20 min, 蒸馏水清洗, 枸橼酸缓冲液微波抗原修复, 冷却后 pH7.2 的 PBS 洗 5 min × 3 次, 滴加牛血清清蛋白 (BSA), 于 37 °C 孵育 40 min, 甩干后滴加稀释的一抗 (TNF-α 1 : 100; ICAM-1 1 : 200) 于湿盒内 4 °C 过夜, 次日取出后置于室温 1 h。PBS 冲洗, 加羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG) 孵育 1 h, SABC 孵育 1 h, 然后 DAB 显色, 苏木素复染, 脱水、透明及封片。400 倍光镜下取肝组织同一区域 3 个不同的视野采图, 记录每高倍视野 TNF-α 阳性表达数, 用 Image proplus 6.0 软件计算 ICAM 阳性表达的累积光密度值 (IOD) 与面积的比值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件对实验数据进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验和单因素方差分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学

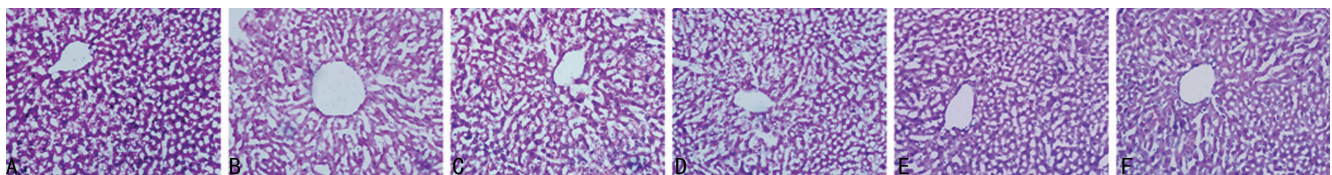
意义。

2 结 果

2.1 橄榄苦苷对 LPS 诱导的 ICR 小鼠肝脏指数的影响 正常对照组小鼠肝指数为 (4.72 ± 0.35)%, LPS 组小鼠肝脏指数明显升高, 为 (5.38 ± 0.38)%, 两组比较, 肝脏指数差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。而橄榄苦苷高剂量组肝脏指数为 (4.84 ± 0.21)%, 甘利欣组肝脏指数为 (4.86 ± 0.20)%, 两组较 LPS 组小鼠肝脏指数均有明显降低 ($P < 0.01$)。橄榄苦苷中剂量组肝脏指数为 (4.98 ± 0.34)%, 较 LPS 组也有降低 ($P < 0.05$); 低剂量橄榄苦苷组肝脏指数为 (5.25 ± 0.39)%, 虽然有所降低, 但与 LPS 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

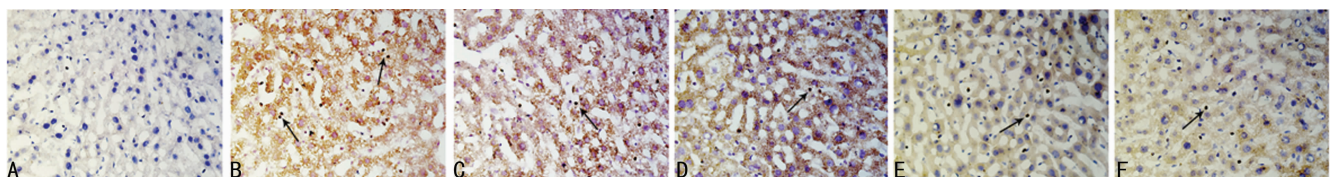
2.2 橄榄苦苷对 LPS 诱导的 ICR 小鼠肝脏组织病理学检查的影响 在 400 倍光镜下, 正常对照组小鼠肝细胞结构清晰, 细胞间间隙紧密均匀, 未见细胞水肿、变性坏死等病理现象; LPS 组小鼠肝脏中央静脉扩张, 肝细胞肿胀、空泡变性, 个别肝细胞出现坏死, 细胞间间隙变宽、排列紊乱; 橄榄苦苷中剂量和高剂量组较 LPS 组肝细胞炎性水肿程度减轻, 细胞间间隙变紧密, 排列相对均匀; 甘利欣组病理现象也有明显改善; 而橄榄苦苷低剂量组对 LPS 导致的肝脏病理损伤没有明显改善, 见图 1。

2.3 橄榄苦苷对 LPS 诱导的 ICR 小鼠肝脏组织 TNF-α 和 ICAM-1 表达的影响 正常对照组肝脏几乎没有 TNF-α 阳性表达, 但在 LPS 诱导组, 大鼠肝细胞质可见大量棕褐色 TNF-α 阳性颗粒表达, 肝细胞呈深染色。橄榄苦苷各组 TNF-α 阳性颗粒较 LPS 组表达呈剂量依赖性减少 ($P < 0.05$); 甘利欣组 TNF-α 阳性表达数量也明显减少, 且肝细胞染色变浅, 与 LPS 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1、图 2。另外, 正常对照组肝脏仅有极少 ICAM-1 阳性表达, 但 LPS 组可见明显的 ICAM-1 棕黄色强阳性表达, 其表达主要出现在肝窦内皮细胞、肝实质细胞; 橄榄苦苷高剂量和中剂量组中 ICAM-1 阳性表达减少, 仅有肝窦内皮细胞可见, 且染色程度减轻; 甘利欣组肝组织 ICAM-1 阳性表达也明显减轻。统计学结果表明, 橄榄苦苷中、高剂量组及甘利欣组小鼠 ICAM-1 阳性细胞表达的 IOD 与面积比值与 LPS 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1、图 3。



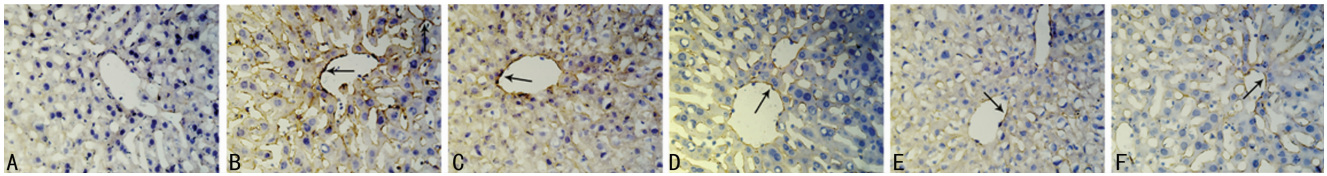
A: 正常对照组; B: LPS 组; C: 橄榄苦苷低剂量组; D: 橄榄苦苷中剂量组; E: 橄榄苦苷高剂量组; F: 甘利欣组。

图 1 橄榄苦苷对 LPS 诱导的 ICR 小鼠肝脏组织病理学检查的影响 (HE, ×400)



A: 正常对照组; B: LPS 组; C: 橄榄苦苷低剂量组; D: 橄榄苦苷中剂量组; E: 橄榄苦苷高剂量组; F: 甘利欣组。

图 2 各组小鼠肝脏组织 TNF-α 表达 (免疫组织化学, ×400)



A: 正常对照组; B: LPS 组; C: 橄榄苦苷低剂量组; D: 橄榄苦苷中剂量组; E: 橄榄苦苷高剂量组; F: 甘利欣组。

图 3 各组小鼠肝脏组织 ICAM-1 的表达(免疫组织化学, $\times 400$)

表 1 橄榄苦苷对 LPS 诱导的 ICR 小鼠肝脏组织 TNF- α 和 ICAM-1 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	TNF- α 阳性表达数	ICAM-1 (IOD/area)
正常对照组	5.06 \pm 2.43 ^b	0.22 \pm 0.06 ^b
LPS 组	31.08 \pm 7.49	0.87 \pm 0.30
橄榄苦苷低剂量组(15 mg/kg)	26.26 \pm 4.59 ^a	0.79 \pm 0.15
橄榄苦苷中剂量组(30 mg/kg)	20.07 \pm 4.97 ^b	0.61 \pm 0.22 ^a
橄榄苦苷高剂量组(45 mg/kg)	17.66 \pm 3.77 ^b	0.52 \pm 0.14 ^b
甘利欣组(11.25 mg/kg)	19.87 \pm 3.91 ^b	0.55 \pm 0.16 ^b

^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与 LPS 组比较。

3 讨 论

肝脏是人体非常重要的器官,承担着解毒、代谢及免疫防御等功能^[3]。在病毒或内毒素刺激的情况下,肝脏细胞特别是 Kupfer 细胞及肝窦内皮细胞大量增殖,合成并释放炎症细胞因子、细胞黏附分子,参与白细胞-肝窦内皮细胞间的黏附和跨内皮迁移,进一步促进炎症反应的病理过程,从而加重肝损伤^[4]。研究表明,LPS 与细胞膜上的受体结合后,激活肝内外单核-巨噬细胞系统,通过其上调核因子 κ B(NF- κ B)、P38 及 JAK/STAT 等炎症信号通路,增加致炎因子的表达,形成瀑布级联效应从而损伤肝脏^[5-7]。

众所周知,橄榄油因具有强大的抗氧化作用而广泛运用于美容、医疗界。而随着研究的不断深入与发展,橄榄苦苷作为橄榄叶中含量较多的苯酚类裂环烯醚萜苷化合物,其具有无毒、易被人体吸收等优势,其药理学效应也逐渐被重视^[8]。有研究表明,橄榄苦苷对 HepG2 2.2.15 细胞乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的表达呈剂量依赖性抑制作用,且体内研究表明其具有抗鸭乙型肝炎病毒(DHBV-DNA)的作用,但其作用机制尚未明确^[9]。这为橄榄苦苷在肝脏疾病的治疗研究提供了契机。

本研究以 LPS 为诱导制作肝脏急性损伤模型,观察橄榄苦苷的保护作用。结果发现,腹腔注射 LPS 导致肝脏的炎性水肿、空泡变性等病理损伤,且肝脏指数明显升高,说明 LPS 成功诱导了肝脏急性损伤。进一步研究发现,模型组也显示作为炎症标志的 TNF- α 和 ICAM-1 在肝脏组织中有较高的表达,说明 LPS 增加了致炎因子的表达,从而导致了病理改变。临床研究证实,肝炎患者血清中往往存在高水平 TNF- α 、ICAM-1 表达,而且,在慢性肝病中,ICAM-1 在肝组织和血清中表达呈相关性增强^[10],这与本研究结果契合。而本研究给予中剂量和高剂量的橄榄苦苷,不仅在一定程度上减轻了 LPS 导致的肝脏病理损伤程度,且肝脏组织切片 TNF- α 、ICAM-1 的阳性表达也有明显的下调,说明橄榄苦苷对 LPS 导致的肝

损伤有一定的保护效应,其作用可能是通过抑制炎症因子及黏附分子的表达,阻止炎症瀑布级联反应,但更深的机制还需进一步的研究。

参考文献

- [1] Oh IS, Park SH. Immune-mediated liver injury in hepatitis B virus infection[J]. Immune Netw, 2015, 15(4): 191-198.
- [2] 陈碧琼, 聂咏飞, 涂华. 中药青果的化学成分及药理作用研究进展[J]. 广州化工, 2012, 40(21): 16-18.
- [3] Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of hepatitis B virus infection[J]. Pathol Biol (Paris), 2010, 58(4): 258-266.
- [4] 胡泽华, 王琳琳. 内毒素血症肝损伤机制的研究进展[J]. 医学综述, 2009, 15(7): 1047-1050.
- [5] Chen W, Lin YJ, Zhou XY, et al. Protective effect of Salvia miltiorrhiza and Carthamus tinctorius extract against lipopolysaccharide-induced liver injury[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(30): 9079-9092.
- [6] Tang J, Li L, Li CM, et al. Upregulation of HO-1 with haemin alleviates LPS-stimulated pro-inflammatory responses through downregulation of p38 signalling pathways in rat liver[J]. Scand J Immunol, 2015, 82(5): 443-451.
- [7] Lv X, Zhang Y, Cui Y, et al. Inhibition of microRNA 155 relieves sepsis induced liver injury through inactivating the JAK/STAT pathway[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(4): 6013-6018.
- [8] Tan HW, Tuck KL, Stupans I, et al. Simultaneous determination of oleuropein and hydroxytyrosol in rat plasma using liquid chromatography with fluorescence detection[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003, 785(1): 187-191.
- [9] Zhao G, Yin Z, Dong J. Antiviral efficacy against hepatitis B virus replication of oleuropein isolated from Jasminum officinale L. var. grandiflorum[J]. J Ethnopharmacol, 2009, 125(2): 265-268.
- [10] 章幼奕, 秦刚, 姚建国, 等. 慢性病毒性肝炎患者血清 sICAM-1 与肝组织病理变化的相关性研究[J]. 实用肝脏病杂志, 2008, 11(3): 159-162.