

网络出版时间:2012-07-18 10:54

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120718.1054.021.html>

魔芋葡甘聚糖对大鼠酒精性脂肪肝的预防效果

杨 芳

(安康学院 农学与生命科学院,陕西省富硒食品工程实验室,陕西 安康 725000)

【摘 要】 【目的】探究魔芋葡甘聚糖(Konjac glucomannan, KGM)对大鼠酒精性脂肪肝的预防作用。**【方法】**将雄性 SD 大鼠随机分成空白对照组、酒精肝模型组、饮用酒精+质量分数 5% KGM 组、饮用酒精+质量分数 10% KGM 组、饮用酒精+质量分数 10% 谷胱甘肽(GSH)组,进行为期 12 周的饲养试验,期间观察大鼠被毛、活动、饮食等一般情况,试验结束时称体质量,并采集血清及肝脏样品,测定其血清谷丙转氨酶(Alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(Aspartate aminotransferase, AST)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyl transpeptidase, γ -GT)的活性;同时观察大鼠肝脏组织形态学改变,进行肝脏脂肪变性程度评分。**【结果】**12 周试验结束后,KGM 预防组大鼠的一般状态比酒精肝模型组好,毛色更光滑,体质量增长更快,差异显著($P < 0.05$);与酒精肝模型组相比,空白对照组及 3 个干预组 ALT、AST、 γ -GT 活性均显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)降低;与酒精肝模型组比较,KGM 干预组肝脏脂肪性病理改变明显减轻,肝脏脂肪变性程度评分极显著降低($P < 0.01$),而与 GSH 预防组比较则无显著差异。**【结论】**由血清肝酶学及肝脏组织学分析结果可知,KGM 对酒精性脂肪肝有一定的预防作用。

【关键词】 大鼠;酒精型脂肪肝;葡甘聚糖;预防

【中图分类号】 S859.79⁺4

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)08-0008-05

Study on the preventive effect of KGM on the rat with alcoholic fatty liver

YANG Fang

(Food Engineering Laboratory of Shaanxi Province, Department of Agriculture and Life Sciences, Ankang University, Ankang, Shaanxi 725000, China)

Abstract: 【Objective】 The study was done to analyze the preventive effect of KGM on alcoholic fatty liver(AFL). **【Method】** The male SD rats were divided into five groups, namely control group, drinking alcohol group, 5% KGM preventive group, 10% KGM preventive group, 10% GSH preventive group. During the twelve weeks of experiment, rat hair, activity, and diet were observed. Body weight was weighed at the end of the test. The rat serum ALT, AST, γ -GT levels were evaluated using an assay kit and histopathology of liver tissue in rats was observed. **【Result】** After 12 weeks, the body weight of three prevention group rats grew faster than drinking alcohol group ($P < 0.05$). KGM could reduce the activity of serum ALT, AST and γ -GT, which had statistically significant differences ($P < 0.05$) or very significant difference ($P < 0.01$) with rats of drinking alcohol group. There was a very significant difference ($P < 0.01$) between preventive group rats and rats of drinking alcohol group which had hepatic steatosis, organization of local inflammation and necrosis. ALT, AST, γ -GT, and liver index had no statistically significant differences between KGM preventive group and GSH preventive group. **【Conclusion】** KGM could reduce the activity of

* [收稿日期] 2012-01-26

[基金项目] 陕西省自然科学基金项目(2010JM4052);陕西省教育厅科技专项(12JK0848)

[作者简介] 杨 芳(1974—),女,陕西旬阳人,讲师,硕士,主要从事富硒食品功能评价研究。E-mail:akxyyf@163.com

serum ALT, AST and γ -GT. The KGM in alcohol continuing role is still effective in the prevention of the occurrence of AFL. Its preventive effect is similar to GSH.

Key words: rat; alcoholic fatty liver; KGM; prevention

近几年,糖生物学成为继基因组学、蛋白质组学之后的另一个生命科学研究热点。2001年,《Science》用 Carbohydrates and Glycobiology 专版介绍了糖生物学各研究方向的进展,预示着糖生物学时代已经到来^[1-4]。有研究表明,许多植物多糖和中药多糖能提高超氧化物歧化酶(Superoxidedismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione-peroxidase, GSH-px)等抗氧化物酶的活性,降低脂质过氧化物含量^[5]。

魔芋为天南星科魔芋属的多年生草本植物,含有丰富的葡甘聚糖(KGM)。作为魔芋的重要抗氧化成分,KGM具有多种药理作用和生物活性功能,其清除自由基、调节脂质代谢、抗脂质过氧化等活性越来越受到人们的关注^[6-8]。

肝脏是酒精代谢的主要场所。乙醇经过内质网微粒体氧化酶系统的代谢,生成过量乙醛,未被氧化的乙醛进入血液,通过黄嘌呤氧化酶转变为超氧化物,氧自由基的增多使脂质过氧化反应增强。机体氧化-抗氧化机制的失衡,进一步使自由基生成增多,并氧化肝细胞膜的脂质和蛋白,导致肝细胞变性、坏死、炎性细胞浸润及肝纤维化改变。长期的酒精摄入可引起酒精性肝病,其早期的病理形态学改变表现为肝脏脂肪变性,而目前除戒酒外,尚无有效的预防措施。

KGM属水溶性纤维,能被肠道细菌所酵解而显著降低胆固醇和血脂,但至今尚缺乏对其预防酒精性脂肪肝的效果及预防机制的深入研究。本试验以谷胱甘肽(glutathione, GSH)作为阳性药物对照,通过在大鼠饮用酒精的同时喂食含KGM特配饲料的方法,建立KGM预防酒精性脂肪肝大鼠模型,分别从肝脏病理形态学、肝酶学角度探讨KGM对酒精性脂肪肝的预防作用,进而分析在酒精持续作用于肝脏的情况下,KGM是否仍具有防止大鼠酒精性脂肪肝发生发展的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物及饲料 SPF级雄性SD大鼠(45只,体质量180~200 g/只,动物许可证号为SCXK2007-001)和专用鼠粮,购自西安交通大学医

学院实验动物中心;大鼠粉状饲料,购于第四军医大学动物实验中心。

1.1.2 试剂及器材 无水乙醇,国产分析纯;丙氨酸氨基转移酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)和 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)试剂盒,购于南京建成生物科技有限公司;纯化魔芋精粉(KGM的质量分数为75.98%^[9]),购于安康九龙魔芋加工生物科技有限公司;还原性GSH,购于日本山之内株式会社。

试验大鼠或宠物特配饲料自制装置(专利号ZL201130010281.6,为本实验室自行设计制作),FD-1D-50型真空冻干机(上海楚定分析仪器有限公司),101-2AB型烘箱(天津市泰斯特仪器有限公司),SY2200-T型超声波清洗机(上海声源超声波仪器设备有限公司),BM II型生物组织包埋机(上海亿欣生物科技有限公司),LR75-D型组织切片机(日本樱花医疗集团),BHS型奥林巴斯光学生物显微镜(日本OLYMPUS株式会社)。

1.2 大鼠特配饲料的制作

将大鼠粉状饲料、添加成分和水按一定比例混合后,成团,将混匀的饲料团块填充到试验大鼠特配饲料自制装置中,压实,然后用注射器的活塞将饲料推出。100 g含质量分数5% KGM的特配饲料中,包括大鼠粉状饲料93.42 g,纯度为75.98%的魔芋精粉6.58 g;100 g含质量分数10% KGM的特配饲料中,包括大鼠粉状饲料86.84 g,纯度为75.98%的魔芋精粉13.16 g;100 g含质量分数10% GSH的特配饲料中,包括大鼠粉状饲料90.00 g,还原性GSH 10.00 g。添加成分为KGM的特配饲料采用高温烘干,添加成分为GSH的特配饲料采用冷冻干燥。

1.3 试验分组与处理

大鼠称体质量、编号后,用简单随机法将其分为5组,每组9只。具体分组情况如下:第1组(空白对照组),不做处理,饲喂专用鼠粮,自由饮水;第2组(酒精肝模型组),根据前期试验^[2]建立的大鼠酒精肝建模方法,在大鼠饮水中加入酒精和蔗糖(每100 mL水中溶解15 g蔗糖),其酒精体积分数依次为5%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,37.5%和40%,按周逐渐递增,在酒精体积分数为40%时持续4周;第3组(质量分数5% KGM干预组)大鼠

在酒精肝模型组处理基础上,按 5 g/(kg·d) 给予大鼠含质量分数 5%KGM 的特配饲料,用于替代相应的专用鼠粮;第 4 组(质量分数 10% KGM 干预组)大鼠在酒精肝模型组处理基础上,按 5 g/(kg·d) 给予大鼠含质量分数 10% KGM 的特配饲料,用于替代相应的专用鼠粮;第 5 组(质量分数 10% GSH 干预组)大鼠在酒精肝模型组处理基础上,按 5 g/(kg·d) 给予大鼠含质量分数 10% GSH 的特配饲料,用于替代相应的专用鼠粮。在试验过程中,5 组大鼠均自由采食,分笼饲养,每笼 4 或 5 只,在室温及稳定湿度条件下,用全价颗粒饲料(脂肪控制在 50 g/kg 以内)喂养,持续时间为 12 周^[10]。

1.4 大鼠肝功能酶活性的测定

大鼠禁食禁饮 12 h,称体质量后,乙醚吸入麻醉,心脏无菌穿刺采血,2 000 r/min 离心 3 min,制备血清,严格按照试剂盒说明书测定血清中 ALT、AST 和 γ -GT 的活性。

1.5 大鼠肝脏标本的处理

采血后处死大鼠,分离肝脏,称量其湿质量后进行大体观察,计算肝指数(肝脏湿质量/大鼠体质量 $\times 100$ ^[11])。常规方法制作肝脏石蜡切片,HE 染色后,在光镜下观察肝脏组织形态,并进行肝脏脂肪变性程度评分。评分标准如下:无脂肪变性为 0 分,含脂肪滴肝细胞占肝小叶面积 $<1/3$ 为 1 分,含脂肪滴肝细胞占肝小叶面积 $\geq 1/3\sim <1/2$ 为 2 分,含脂肪滴肝细胞占肝小叶面积 $\geq 1/2\sim <2/3$ 为 3 分,含脂肪滴肝细胞占肝小叶面积 $\geq 2/3$ 为 4 分,脂肪变性以大泡性为主^[12]。

1.6 统计学分析

数据分析采用 SPSS13.0 统计软件,多组间比较采用方差分析,多组间两两比较采用多重比较分

析。

2 结果与分析

2.1 试验期间大鼠的一般情况观察

空白对照组大鼠皮毛有光泽,行动灵活,进食量及大便正常,体质量增长较快,至 12 周时达(504 $\pm$ 41) g/只。3 个干预组大鼠皮毛光泽稍暗,进食量略低于空白对照组,饮水量在试验前 3 周接近空白对照组,随着饮水中酒精体积分数的增高,饮水量在第 4 周后明显少于空白对照组。除质量分数 10% GSH 干预组有 2 只大鼠出现颈部淋巴结肿大(组织切片为淋巴结脓肿,原因不明)外,其余大鼠体质量增长较快。酒精肝模型组大鼠在饮用酒精后数十分钟出现困倦,动作迟缓,步态不稳,部分酣睡,需 2~3 h 方可完全恢复常态,进食减少,体质量下降,精神不振,2 周后上述症状减轻,但皮毛渐粗糙且失去光泽,体质量增长缓慢,至 12 周时为(401 $\pm$ 30) g/只,与空白对照组差异显著($P<0.05$)。第 12 周末,质量分数 5% KGM 干预组、10% KGM 干预组、10% GSH 干预组大鼠体质量分别为(476 $\pm$ 16),(470 $\pm$ 32)和(459 $\pm$ 29) g/只,3 个干预组与酒精肝模型组相比,体质量增长较快,差异均达显著水平($P<0.05$)。12 周末,各组大鼠均无死亡。

2.2 魔芋 KGM 对大鼠肝功能酶和肝脏指数的影响

由表 1 可见,与酒精肝模型组相比,空白对照组及 3 个干预组 ALT、AST、 γ -GT 活性均显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)降低。

由表 1 还可知,3 个干预组的肝脏指数均极显著($P<0.01$)低于酒精肝模型组;空白对照组肝脏指数也极显著($P<0.01$)低于酒精肝模型组。

表 1 魔芋 KGM 对大鼠酒精肝 ALT、AST、 γ -GT 活性和肝脏指数的影响($n=9$)
Table 1 Effect of KGM on ALT,AST, γ -GT activity and liver index of rat with AFL ($n=9$)

组别 Group	ALT/(IU·L ⁻¹)	AST/(IU·L ⁻¹)	γ -GT/(IU·L ⁻¹)	肝脏指数 Liver index
空白对照组 Control group	18.81 $\pm$ 3.19**	26.84 $\pm$ 3.99**	1.29 $\pm$ 0.47**	2.97 $\pm$ 0.25**
酒精肝模型组 Drinking alcohol group	50.11 $\pm$ 5.32	78.07 $\pm$ 9.85	4.55 $\pm$ 0.49	3.53 $\pm$ 0.17
5% KGM 干预组 5% KGM preventive group	25.63 $\pm$ 5.59**	25.02 $\pm$ 3.07**	2.84 $\pm$ 0.39**	2.77 $\pm$ 0.15**
10% KGM 干预组 10% KGM preventive group	19.15 $\pm$ 3.93**	26.32 $\pm$ 2.99**	2.56 $\pm$ 0.23*	3.20 $\pm$ 0.18**
10% GSH 干预组 10% GSH preventive group	24.63 $\pm$ 3.69**	22.59 $\pm$ 2.56**	2.44 $\pm$ 0.56*	2.74 $\pm$ 0.12**

注:与酒精肝模型组比较,标*表示差异显著($P<0.05$),标**表示差异极显著($P<0.01$)。下表同。
Note:Comparison with drinking alcohol group,mark* shows significant difference ($P<0.05$),mark** shows very significant difference ($P<0.01$). The same as in the following table.

2.3 魔芋 KGM 对大鼠肝脏病理组织学变化的影响

由肝脏组织切片 HE 染色结果可以看出,空白对照组大鼠肝小叶结构正常,肝细胞索排列有序,未

见脂肪变性、坏死,无炎症细胞浸润,无纤维增生(图 1A);酒精肝模型组肝细胞胞质中可见大小不等的圆形脂滴空泡(图 1B),有的出现在肝小叶的中央

区,也有的出现在肝脏被膜下,同时伴有不同程度的局部炎症和坏死(图 1C);KGM 干预组和 GSH 干预组大鼠肝脏肝细胞索排列整齐,肝窦正常,肝脏脂肪变性程度较低,而且空泡为小空泡或细小空泡(图

1D、E、F)。

由表 2 可知,12 周试验结束时,空白对照组、3 个干预组大鼠肝脏脂肪变性程度评分极显著($P<0.01$)低于酒精肝模型组。

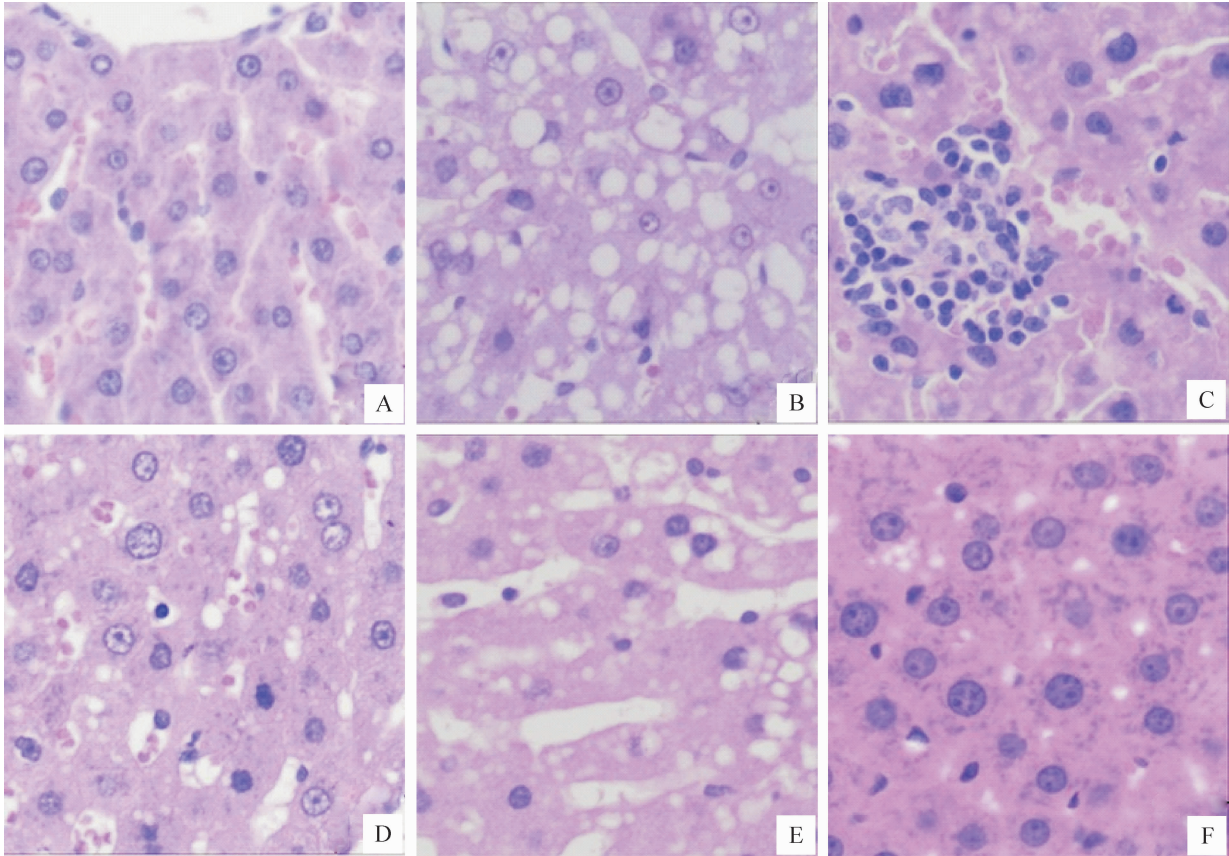


图 1 魔芋 KGM 对大鼠酒精肝病理组织学变化的影响(HE,×400)

A. 空白对照组;B. 酒精肝模型组,肝细胞中有大空泡;C. 酒精肝模型组,伴炎性细胞浸润;
D. 质量分数 5% KGM 干预组;E. 质量分数 10% KGM 干预组;F. 质量分数 10% GSH 干预组

Fig. 1 Effect of KGM on the liver histopathological changes of rat with AFL

A. Control group;B. Drinking alcohol group,liver cells have big fat vacuoles;C. Drinking alcohol group,accompanied by the infiltration of inflammatory cells;D. 5% KGM preventive group;E. 10% KGM preventive group;F. 10% GSH preventive group

表 2 魔芋 KGM 对大鼠酒精肝肝脏脂肪变性程度评分的影响($n=9$)

Table 2 Effect of KGM on the fatty liver degree histopathology integral of rat with AFL ($n=9$)

组别 Group	脂肪变性程度评分 Histopathology integral	组别 Group	脂肪变性程度评分 Histopathology integral
空白对照组 Control group	0.00±0.000**	10% KGM 干预组 10% KGM preventive group	0.67±0.500**
酒精肝模型组 Drinking alcohol group	2.33±0.817	10% GSH 干预组 10% GSH preventive group	0.56±0.527**
5% KGM 干预组 5% KGM preventive group	0.78±0.441**		

3 讨 论

随着饮酒人数及人均酒精消费量的增多,酒精对人体肝脏的损害日益成为一个全球性的问题。酒精性脂肪肝是最早、最常见的慢性肝损害之一。酒

精通过诱导某些 CYP450 酶导致肝微粒体自由基产生增多、内源性抗氧化剂消耗增加及脂质过氧化反应增强,从而造成酒精性肝损伤。GSH 是广泛存在于生物体内的活性肽,其作为各种代谢途径中的某些酶的辅助因子,参与细胞内许多化合物的代谢,能

清除药物、毒物等代谢中产生的自由基,是生化系统中主要的抗氧化成分^[13],在参与肝细胞的代谢、解毒、抗损伤中发挥着重要作用,临床上已被广泛用于治疗酒精性肝炎、中毒性肝炎、病毒性肝炎等^[14]。许多研究发现,氧化应激与脂质过氧化在酒精导致的肝脏损伤中起重要作用^[15]。许多生物活性多糖(Biologically active polysaccharides, BAP)可通过直接清除活性氧(Reactive oxygen species, ROS)以及络合产生 ROS 所必需的金属离子等途径来实现抗氧化和保护肝脏的作用^[5]。本试验结果显示, KGM 预防组大鼠的一般状态比酒精肝模型组好,毛色更光滑,体质量增长更快,差异显著($P<0.05$); ALT、AST 活性差异极显著($P<0.01$), γ -GT 活性差异显著($P<0.05$); 肝脏脂肪性病理改变明显减轻,差异极显著($P<0.01$); 与 GSH 预防组比较,则无显著差异。以上结果表明, KGM 在酒精持续作用下仍能有效地预防酒精肝的发生,其预防效果与 GSH 相似。至于 KGM 预防酒精肝的具体机制及其是否能够干扰酒精的吸收,还有待于进一步研究分析。

[参考文献]

[1] Rudd P M, Elliott T, Cresswell P, et al. Glycosylation and the immune system [J]. Science, 2001, 291(5512): 2370-2376.

[2] Ari H, Markus A. Intracellular functions of N-linked glycans [J]. Science, 2001, 291(5512): 2364-2369.

[3] Joseph A. Searching for medicine's sweet spot [J]. Science, 2001, 291(5512): 2338-2343.

[4] Hurtley S, Service R, Szuromi P. Cinderella's coach is ready [J]. Science, 2001, 291(5512): 2323-2340.

[5] 周林珠, 杨祥良, 周井炎, 等. 多糖抗氧化作用研究进展 [J]. 中国生化药物杂志, 2002, 23(4): 210-212.

Zhou L Z, Yang X L, Zhou J Y, et al. Advances of the antioxidative activities research of polysaccharides [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2002, 23(4): 210-212. (in Chinese)

[6] 刘雨桃, 王子平. 魔芋葡甘聚糖的应用及研究进展 [J]. 华西药

学杂志, 2008, 23(2): 188-189.

Liu Y T, Wang Z P. The review of utilization and research pro-

gress of konjacglucomannan [J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008, 23(2): 188-189. (in Chinese)

[7] 张 驰, 刘信平, 江 莉. 魔芋中多糖提取技术及含硒形态研究 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(11): 3364, 3405.

Zhang C, Liu X P, Jiang L. Study on polysaccharide extraction technology and selenium forms in amorphophallus konjac [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2007, 35(11): 3364, 3405. (in Chinese)

[8] Llanaez P, González C, Fernandez-Inárrrea J, et al. Selenium and health-related quality of life in menopausal women [J]. Menopause Int, 2009, 15(4): 144-149.

[9] 杨 芳, 谢娟平, 王中兴, 等. 富硒魔芋精粉葡甘聚糖和硒含量的测定分析 [J]. 陕西农业科学, 2011, 57(2): 61-63.

Yang F, Xie J P, Wang Z X, et al. A study on determination of glucomannan and selenium in several kinds of konjac powder [J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2011, 57(2): 61-63. (in Chinese)

[10] 杨 芳, 韩玉翠. 大鼠酒精性脂肪肝两种建模方法的比较 [J]. 山东医药, 2011, 51(13): 15-17.

Yang F, Han Y C. Comparison of rats with chronic alcoholic fatty liver model improved methods [J]. Shandong Medical Journal, 2011, 51(13): 15-17. (in Chinese)

[11] Feng Z Q, Shen Z X, Tan S Y, et al. Improvement of induction method of acute alcoholic fatty liver model in rats [J]. World Chin J Digestol, 2003, 11(8): 1189-1192.

[12] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊断标准 [J]. 中华肝脏病杂志, 2003, 11(2): 72.

The Chinese liver disease association of fatty liver and alcoholic liver disease study group. Diagnostic criteria of alcoholic liver disease [J]. Chinese Journal of Hepatology, 2003, 11(2): 72. (in Chinese)

[13] Kostrubsky V E, Strom S C, Wood S G, et al. Ethanol and isopentanol increase CYP3A and CYP2E in primary cultures of human hepatocytes [J]. Arch Biochem Biophys, 1995, 322(2): 516-522.

[14] Ellouk-Achard S, Levresse V, Martin C, et al. Ex vivo and in vivo models in acetaminophen hepatotoxicity studies: Relationship between glutathione depletion, oxidative stress and disturbances in calcium homeostasis and energy metabolism [J]. Arch Toxicol, 1995, 17(4): 209.

[15] Altavilla D, Marini H, Seminara P, et al. Protective effect of antioxidant raxofelast in alcohol-induced liver disease in mice [J]. Pharmacology, 2004, 74(1): 6-14.