

法夫酵母类胡萝卜素提取物对肝损伤的保护作用

邓思¹, 王海琪¹, 白曼利¹, 杨远帆^{1,2,3,4}, 黄高凌^{1,2,3,4}, 杜希萍^{1,2,3,4}, 倪辉^{1,2,3,4}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021;
3. 厦门市食品与生物工程技术研究中心, 福建 厦门 361021;
4. 厦门南方海洋研究中心海藻资源化利用与深加工重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 为了明确法夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)类胡萝卜素提取物对化学性肝损伤大鼠丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)肝细胞坏死程度的影响,建立CCl₄诱导大鼠化学性肝损伤模型,将60只大鼠随机分成6组,分别是正常组,模型组,联苯双酯组,低、中、高剂量组(受试样品剂量分别为0.187 5、0.375、0.75 g/kg),检测大鼠血清中ALT、AST活性,并观察肝脏细胞的病理损伤情况。结果显示,法夫酵母类胡萝卜素高剂量组大鼠血清ALT与模型组比较显著降低($P < 0.05$),受试样品不同剂量组大鼠的肝细胞病变均有不同程度的减轻。表明,法夫酵母类胡萝卜素提取物对大鼠化学性肝损伤有辅助保护作用。

[关键词] 法夫酵母;类胡萝卜素;四氯化碳;化学性肝损伤;病理学检查

[中图分类号] R 285.5

The Protective Effects of Carotenoids Extract from *Phaffia rhodozyma* on Hepatic Injury

DENG Si¹, WANG Haiqi¹, BAI Manli¹, YANG Yuanfan^{1,2,3,4}, HUANG Gaoling^{1,2,3,4},
DU Xiping^{1,2,3,4}, NI Hui^{1,2,3,4}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;
2. Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, China;
3. Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen 361021, China;
4. Key Laboratory of Systemic Utilization and In-depth Processing of Economic Seaweed,
Xiamen Southern Ocean Technology Center of China, Xiamen 361021, China)

Abstract: The protective effects of carotenoids extract from *Phaffia rhodozyma* on chemical-induced liver injuries in rats were determined. Sixty rats were randomly divided into six groups: normal group, model group, bifendate group and test groups treated with low dose (0.187 5 g/kg), medium dose (0.375 g/kg) and high dose (0.75 g/kg) of carotenoids extract. Except the normal group, other groups were liver-injured by carbon tetrachloride (CCl₄). The activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum were detected, and the pathologic changes of liver were observed. Compared with model group, the ALT activity in rat serum of the high does group carotenoids extract significantly decreased ($P < 0.05$). The test sample with different dose groups could reduce the hepatic necrosis in chemical-induced liver injuries by

[收稿日期] 2018-05-02

[修回日期] 2018-07-16

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31501448);福建省教育厅项目(JA15266)

[作者简介] 邓思(1992—),女,硕士生,主要从事天然化合物分离纯化及生物活性研究。通信作者:杜希萍(1978—),女,副教授,博士,主要从事天然产物化学研究。E-mail:xipingdu@jmu.edu.cn

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

CCl₄ in rats. These results suggested that the carotenoids extract from *P. rhodozyma* had auxiliary effects in protecting chemical-induced liver injuries in rats.

Keywords: *Phaffia rhodozyma*; carotenoids; CCl₄; chemical hepatic injury; pathological examination

0 引言

法夫酵母 (*Phaffia rhodozyma*) 是一种能利用多种碳源和氮源进行异养代谢合成各种类胡萝卜素的红色酵母, 其中的类胡萝卜素包含虾青素^[1-3]、 β -胡萝卜素^[4-5]、海胆酮、玉米黄质、 β -隐黄质、番茄红素^[6]及斑蝥黄等^[7]。由于法夫酵母代谢合成类胡萝卜素时不受气候和地域等因素的影响, 因而它具有生长快、高密度培养容易、虾青素积累迅速且活性强等特点, 是一类极具产业化发展前景的天然虾青素资源。

肝损伤是一种急性肝脏功能异常的疾病^[8], 它是由肝缺血再灌注、有毒物质、肝毒性药物以及病毒感染等因素导致的。一般情况下, 造成机体肝硬化、肝癌的主要因素是肝纤维化的产生^[9], 而肝纤维化一般是由持续长时间的肝损伤诱发的^[10-11]。一般在临床上, 防止和预防肝损伤是肝病治疗不可或缺的防御环节, 早期及时发现和对症治疗均对预防肝病意义重大^[12]。

肝损伤一般分为化学性肝损伤和病理性肝损伤两类^[13], 其中临床上最为常见的是化学性肝损伤。而实验中常用 CCl₄、酒精等使肝脏中毒, 形成化学性肝损伤的模型^[14-15]。CCl₄对肝脏的毒性存在多种作用机制, 其中导致机体产生过量自由基被认为是肝损伤发生的主导因素^[16]。过量的自由基不仅攻击肝细胞膜上的磷脂分子, 损伤细胞膜的完整性, 而且可引起肝细胞脂质过氧化, 诱发细胞死亡。同时, 自由基也可与肝细胞内大分子发生共价结合, 攻击膜不饱和脂质, 细胞膜的稳定性被破坏以及通透程度加大, 丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 等从细胞质中大量溢出进入血液中。因此, 评价肝损伤的指标可转化为测定血清中 ALT 和 AST 的活性。相关研究表明^[17-18], 多种广泛使用且效果稳定的药物如维生素 E、褪黑素、乙酰半胱氨酸等都可以通过清除自由基或者抑制自由基的产生起到减弱肝损伤的功能。

如今, 随着化学性肝损伤病人的增加, 研发对化学性肝损伤具有保护作用的保健食品已成为研究热点之一。而类胡萝卜素不仅具有较强的清除自由基和淬灭活性氧的能力^[19], 而且能有效防止脂质过氧化^[20-21]。因此, 本文采用溶剂浸提法提取法夫酵母类胡萝卜素, 通过建立 CCl₄ 诱导大鼠化学性肝损伤模型, 检测大鼠血清中 ALT、AST 活性, 并观察肝脏细胞的病理损伤情况, 研究其对化学性肝损伤的作用, 为保护化学性肝损伤的天然保健食品的研发提供技术支持和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

从广东省购买 60 只 SPF 级的雄性 SD 大鼠 (批准号 SCXK (粤) 2013-0002), 且这 60 只大鼠的体质量均在 160~180 g。将 60 只大鼠进行 4 d 的检疫, 选定健康的大鼠进行实验。每天定期检查大鼠 1 次, 除去不健康的大鼠, 如此往复, 将检疫后最终健康的大鼠进行正式实验。进行实验之前, 使用饱和苦味酸对 60 只大鼠进行编号, 其中大鼠的不同部位也同样需要染色编号处理, 这两种处理就组成了 60 只大鼠的双重识别标记。采用一箱 5 只大鼠的分配方式将 60 只大鼠进行分组群养, 对所有的大鼠均使用昼夜时间比为 10 h: 14 h 的方式进行间断照明处理。在实验过程中, 按照要求对 60 只大鼠均喂以相应的颗粒饲料, 允许它们在饲养期间自由进食饮水。为了确保最终实验结果的可靠性, 在饲养过程中, 保证了环境相对稳定。

1.1.2 虾青素标准品

虾青素标准品 (100%, United States Pharmacopeia Reference Standard (USP)) 购置于美国 Sigma

公司。

1.1.3 主要试剂

玉米油购于益海粮油工业有限公司;联苯双酯滴丸试剂购于广州白云山星群(药业)股份有限公司;CCl₄购于广州市中南化学试剂有限公司;橄榄油购于上海凌峰化学试剂有限公司;乌拉坦购于国药集团化学试剂有限公司;ALT和AST试剂盒均购于上海科华生物工程股份有限公司,批号分别为20151222和20151122。

1.2 主要仪器与设备

BS-3000A电子天平,上海友声衡器有限公司;CS-VI型摊片烤片机,湖北孝感医用仪器有限公司;RM2235型轮转切片机、ASP300S型全自动脱水机、EG1150型生物组织包埋机、AutoStainer-XL型自动染色机均为德国LEICA®。

1.3 方法

1.3.1 类胡萝卜素提取物的制备

称取10 g法夫酵母菌体(厦门汇盛生物有限公司提供)于500 mL离心杯中,向离心杯中加入6 mol/L的乳酸溶液200 mL,用玻璃棒将其搅拌均匀,于30 ℃的水浴条件下进行破壁处理10 min。恒温水浴结束后,4 500 r/min离心10 min。离心后除掉上层粘稠的乳酸溶液,将200 mL蒸馏水加入离心杯中,用玻璃棒搅拌均匀。将加入蒸馏水的菌体液再次4 500 r/min进行离心10 min。离心后除掉上层液体,用蒸馏水反复进行以上操作3次。将200 mL丙酮加入离心杯底剩余的菌体中,用玻璃棒搅拌均匀,在常温下浸提5 min。浸提结束后,4 500 r/min离心10 min。收集离心后的上清液,在旋转蒸发器上浓缩上清液,对浸提液丙酮进行回收,最终得到的类胡萝卜素浸膏即为试验的受试物。

1.3.2 类胡萝卜素提取物成分的分析

采用高压液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)对类胡萝卜素提取物中的成分进行分析。由超纯水(A泵)及甲醇(B泵)组成高效液相色谱的溶剂系统,用ZORBAX SB-C18色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 3.5 μm)对样品进行梯度洗脱,洗脱条件如表1所示。检测波长为474 nm,进样量为5 μL,柱温为35 ℃,流速为0.2 mL/min。

表1 ZORBAX SB-C18 色谱柱的梯度洗脱条件

Tab.1 The gradient elution conditions of ZORBAX SB-C18 columns

时间 Time/min	φ(超纯水 Ultra-pure water) /% (A 泵)	φ(甲醇 Methanol) /% (B 泵)
0	15	85
40	0	100
58	0	100
66	15	85

1.3.3 大鼠分组和处理

将实验室检疫合格后的大鼠按照质量随机分成6组,每组10只,分别为正常组,模型组,联苯双酯组,低、中、高剂量组。用玉米油将受试物稀释至75.0, 37.50, 18.75 g/L后分别用于高、中、低3个剂量组对大鼠进行灌胃处理,以上实验的灌胃剂量分别相当于人体临床用量的10倍、5倍、2.5倍(受试样品的急性经口毒性为LD₅₀ > 15 g/kg,人体临床用量约为0.075 g · kg⁻¹ · d⁻¹)。正常组和模型组大鼠每日经口灌胃相同量的玉米油,联苯双酯组则每日经口灌胃剂量质量浓度为15 g/L的联苯双酯滴丸。调节药物浓度,采用10 mL/kg给大鼠进行30 d连续灌胃给药处理,1次/d。在对大鼠进行灌胃处理的30 d内,每天都需要对大鼠的状态进行相应的观察,并详细记录。在30 d灌胃试验开始以及结束时,均需要对大鼠的质量进行1次测量。在灌胃试验期间,每周都需要对大鼠的质量进行2次测量,并详细记录^[22-24]。

1.3.4 大鼠肝损伤的CCl₄模型构建

在试验第30 d将各试验组大鼠隔夜禁食不禁水约16 h后,正常组给予橄榄油,其余各试验组的大鼠则从腹腔处注射质量分数40% CCl₄橄榄油溶液(按10 mL/kg)^[25]。将相对应剂量的受试样品于

4 h 后灌胃给不同剂量组的大鼠, 而将同等量的玉米油灌胃给正常组和模型组的大鼠, 最后按照 10 mL/kg 的量对联苯双酯组的大鼠进行联苯双酯滴丸的灌胃。

1.3.5 血清生化指标测定

注射 CCl_4 处理大鼠 24 h 后, 测定大鼠血清中 AST 和 ALT 的活力水平。

1.3.6 肝脏组织病理检查

解剖大鼠取其肝脏, 将肝脏固定后进行病理组织学的检查。在普通光学显微镜下对大鼠的肝结构进行观察并详细记录, 根据病变程度对其进行组织学的评分^[26], 评分标准如表 2 所示。

表 2 组织学评分标准
Tab.2 Histological scoring criteria

病变分类 Lesion classification	细胞损伤情况 Situation of cell damage	评分 Score
气球样变 Changes of balloon-like	大致正常 Roughly normal	0
脂肪变性 Steatosis	病变肝细胞占 <1/4 的整个视野 Diseased liver cells account less than one quarter of the entire field	1
胞浆凝聚 Cytoplasmic condensation	病变肝细胞占 1/4 ~ 2/4 的整个视野 Diseased liver cells account for one quarter to two quarters of the entire field	2
水样变性 Degeneration of water sample	病变肝细胞占 2/4 ~ 3/4 的整个视野 Diseased liver cells account for two quarters to three quarters of the entire field	3
肝细胞坏死 Hepatocyte necrosis	病变肝细胞占 3/4 ~ 4/4 的整个视野 Diseased liver cells account for three quarters to four quarters of the entire field	4

1.4 数据分析处理

用统计软件 SPSS 21.0 处理试验数据, 对数据进行组间方差分析, 如果组间方差齐, 或转换后数据的组间方差齐, 则采用单因素方差分析 (LSD 法)。若数据的方差经过转换后仍不齐, 则采用秩和检验分析。数据以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 检验水平 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 表示显著性差异。

2 结果与分析

2.1 类胡萝卜素提取物成分的分析

采用 HPLC 分析方法, 对类胡萝卜素提取物成分与已有的类胡萝卜素标准品 (海胆酮、 β -胡萝卜素等) 进行比较, 结果如图 1 和图 2 所示。将图 1 与图 2 进行对比分析可知, 类胡萝卜素提取物的主要成分为虾青素, 且虾青素在类胡萝卜素提取物中所占的质量分数高达 70.24%。而没有发现与保留时间分别为 18.570, 23.147, 39.091 min 相近的类胡萝卜素标准品 (海胆酮保留时间 45.926 min, β -胡萝卜素保留时间 60.213 min 等)。

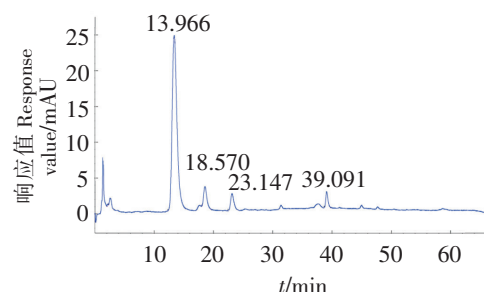


图 1 法夫酵母类胡萝卜素提取物的高效液相色谱图

Fig.1 HPLC of the carotenoids extract from *P. rhodomyces*

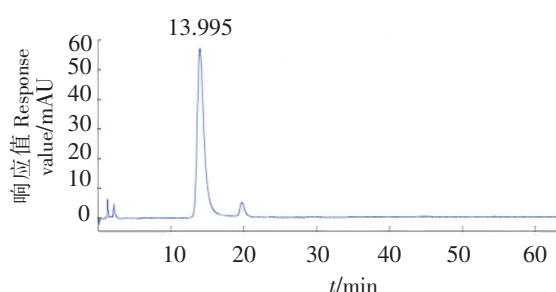


图 2 虾青素标准品的高效液相色谱图

Fig.2 HPLC of astaxanthin standard substance

2.2 类胡萝卜素提取物对大鼠质量的影响

在 30 d 试验期间, 每组大鼠的生理状态均正常, 类胡萝卜素提取物对每组大鼠质量的影响情况

如表3所示。由表3可知:模型组与正常组比较,两组中的大鼠在测定期间质量均没有统计学差异, $P > 0.05$;低、中、高3个剂量组的大鼠分别与模型组比较,除了中剂量组的大鼠在第8 d和第15 d时质量有所减轻 ($P < 0.05$)之外,其余各组大鼠的质量在测定时期均无统计学差异 ($P > 0.05$)。

表3 类胡萝卜素提取物对大鼠体质量的影响

Tab.3 Effects of carotenoids extract on body weight of rats

t/d	m/g					
	正常组 Normal group	模型组 Model group	联苯双酯组 Bifendate group	低剂量组 Low dose group	中剂量组 Midium dose group	高剂量组 High dose group
1	220.2 ± 5.1	219.0 ± 6.5	221.3 ± 8.8	224.7 ± 8.1	218.3 ± 6.4	221.4 ± 5.6
4	266.4 ± 6.4	264.9 ± 9.0	259.6 ± 13.8	268.8 ± 10.2	259.3 ± 9.1	265.7 ± 9.3
8	300.7 ± 9.2	298.3 ± 13.2	301.0 ± 17.3	304.2 ± 15.6	285.8 ± 9.3 *	294.6 ± 13.2
11	325.6 ± 11.4	321.8 ± 13.2	330.3 ± 19.2	331.3 ± 18.9	309.6 ± 11.2	318.8 ± 17.4
15	361.9 ± 13.6	356.1 ± 17.8	364.0 ± 23.2	362.1 ± 25.1	336.9 ± 12.6 *	350.7 ± 22.3
18	380.7 ± 15.1	381.2 ± 17.4	386.2 ± 27.7	379.9 ± 25.9	357.2 ± 15.3	369.8 ± 26.4
22	407.3 ± 20.7	401.9 ± 23.5	411.3 ± 34.4	408.5 ± 31.6	379.1 ± 18.5	393.4 ± 27.9
25	426.9 ± 21.7	419.4 ± 27.9	431.1 ± 38.5	428.7 ± 37.9	394.0 ± 19.2	406.6 ± 29.9
29	456.7 ± 26.1	444.0 ± 31.6	459.0 ± 43.2	450.9 ± 42.0	417.7 ± 19.7	435.1 ± 32.1
30	457.1 ± 25.7	445.7 ± 32.0	460.6 ± 43.2	451.5 ± 42.3	419.7 ± 20.1	437.6 ± 32.6

说明: *表示与模型组之间的比较,且“*”表示有统计学差异, $P < 0.05$

Notes: * indicated the comparison with the model group, and indicated statistical difference, $P < 0.05$

2.3 类胡萝卜素提取物对大鼠血清 ALT、AST 活力的影响

类胡萝卜素提取物对试验中各组大鼠血清指标影响结果如表4所示。由表4可以看出:与正常组相比,模型组大鼠血清中的ALT、AST显著升高,有统计学差异, $P < 0.05$,表明CCl₄对肝脏有明显损伤作用。与模型组比较,低、中两个剂量组的大鼠血清中ALT、AST的活力均无统计学差异, $P > 0.05$,但联苯双酯组和高剂量组中大鼠血清ALT活力有所降低,有统计学差异, $P < 0.05$,表明联苯双酯滴丸与高剂量法夫酵母类胡萝卜素提取物均对大鼠的肝脏组织有一定程度的保护作用。

表4 类胡萝卜素提取物对大鼠血清 ALT、AST 活力的影响

Tab.4 Effects of carotenoids extract on the level of serum ALT and AST in rats

组别 Group	受试物质量比 Test substance	ALT 活力 ALT activity	AST 活力 AST activity
	mass ratio/(g · kg ⁻¹)	/(U · L ⁻¹)	/(U · L ⁻¹)
正常组 Normal group	0	37 ± 8	85 ± 29
模型组 Model group	0	440 ± 151 ^{##}	470 ± 112 ^{##}
联苯双酯组 Bifendate group	0.150	140 ± 102 * *	549 ± 205
低剂量组 Low dose group	0.187 5	418 ± 226	588 ± 200
中剂量组 Midium dose group	0.375	523 ± 253	635 ± 374
高剂量组 High dose group	0.750	288 ± 104 *	627 ± 287

说明: #表示与正常组之间的比较,其中“#”表示 $P < 0.05$,而“##”表示 $P < 0.01$ 。*表示与模型组之间的比较,其中“*”表示 $P < 0.05$,而“* *”表示 $P < 0.01$

Notes: # indicated a comparison with the normal group, indicating $P < 0.05$, while ## indicating $P < 0.01$. * indicated a comparison with the model group, indicating $P < 0.05$, while * * indicating $P < 0.01$

2.4 类胡萝卜素提取物对大鼠肝脏组织病理学的影响

对大鼠肝脏组织进行病理学检查,其结果如图3所示。正常组大鼠的肝脏组织良好,无异常变化(见图3a)。模型组和低剂量组大鼠的肝脏组织损伤最为严重,表现为:在中央静脉附近出现了脂肪变性的现象,有小空泡,呈圆形,部分肝细胞坏死甚至崩解,产生炎性细胞的聚集;在脂肪变性病灶

的外缘,大量肝细胞发生气球样变,细胞肿大,细胞核浓缩甚至消失,胞质空化,如图 3b 和图 3d 所示。与模型组比较,联苯双酯组和高剂量组仅仅出现少数肝细胞坏死或崩解,气球样变(见图 3c 和图 3f)。中剂量组则发生部分肝细胞坏死或崩解,气球样变(图 3e)。以上结果表明,联苯双酯滴丸和不同剂量的类胡萝卜素提取物对大鼠的肝脏具有一定程度的保护作用,其中高剂量的法夫酵母类胡萝卜素提取物对大鼠的肝脏保护作用最为显著。

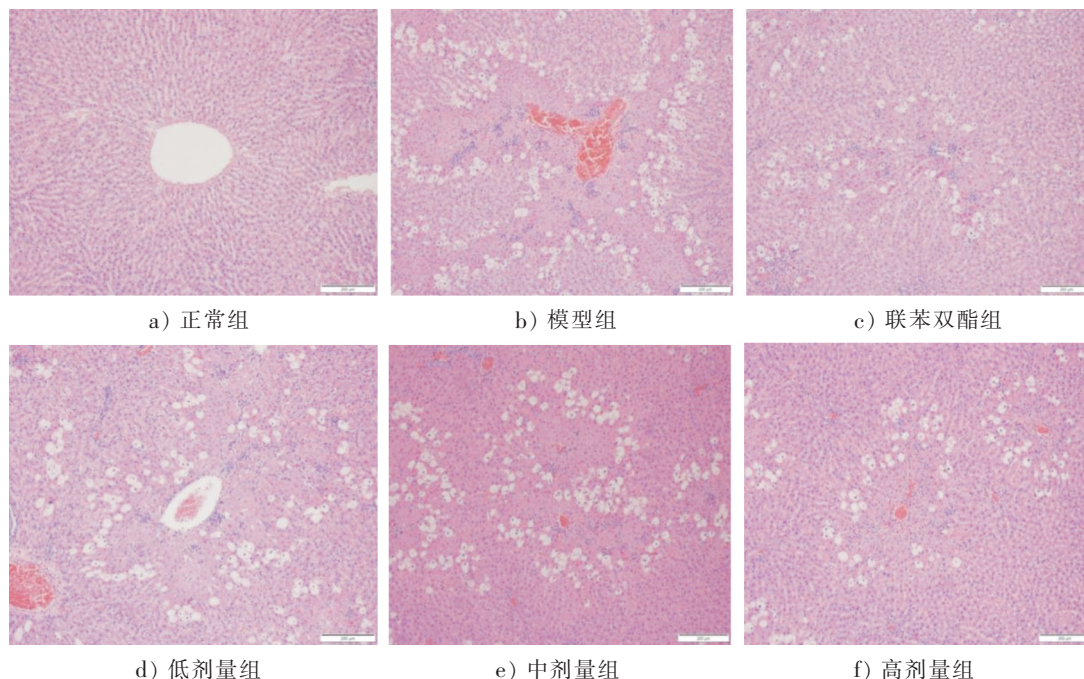


图 3 大鼠肝脏组织病理学检查的结果($\times 100$)

Fig.3 The results of rats histopathological examination($\times 100$)

试验过程中对大鼠肝脏组织进行病理学评分,其结果如表 5 所示。由表 5 可知,模型组与正常组比较,模型组大鼠的肝脏细胞损伤严重,差异显著($P < 0.05$),主要表现为气球样变、脂肪变性、肝细胞坏死等现象。

表 5 类胡萝卜素提取物对大鼠肝脏组织病理学的评分结果

Tab.5 Grading results of carotenoids extract on the liver histopathology of rats

组别 Group	病理改变(积分) Pathological change(integration)				
	胞浆凝聚 Cytoplasmic condensation	气球样变 Changes of balloon-like	脂肪变性 Steatosis	水样变性 Degeneration of water sample	肝细胞坏死 Hepatocyte necrosis
正常组 Normal group	0	0	0.7 ± 1.6	2.8 ± 1.0	0.2 ± 0.4
模型组 Model group	0	$8.3 \pm 3.4^{\#}$	$10.6 \pm 2.5^{\#}$	3.4 ± 0.4	$7.6 \pm 1.6^{\#}$
联苯双酯组 Bifendate group	0	6.6 ± 2.7	7.9 ± 3.5	2.7 ± 0.6	$4.1 \pm 1.5^*$
低剂量组 Low dose group	0	5.0 ± 2.9	$6.9 \pm 1.8^*$	2.7 ± 0.7	6.9 ± 1.4
中剂量组 Midium dose group	0	9.0 ± 2.0	9.1 ± 1.7	3.0 ± 0.4	$6.4 \pm 0.8^*$
高剂量组 High dose group	0	6.1 ± 2.0	$5.8 \pm 1.7^*$	2.9 ± 0.7	$5.4 \pm 1.3^*$

说明:单因素方差分析的指标为脂肪变性和肝细胞坏死,进行变量转换的单因素方差分析的指标为水样变性,秩和检验的指标为气球样变。 $\#$ 表示与正常组之间的比较,其中“ $\#$ ”表示 $P < 0.05$,而*则表示与模型组之间的比较,其中“*”表示 $P < 0.05$

Notes: The index of single factor ANOVA were steatosis and hepatocyte necrosis. The index of variable conversion of single factor ANOVA was water sample, and the index of rank-sum test was balloon-like. $\#$ indicated a comparison with the normal group, indicating $P < 0.05$, while * indicated a comparison with the model group, indicating $P < 0.05$

联苯双酯组与模型组比较,联苯双酯组中只有肝细胞坏死这一个指标差异显著,其余病变指标均没有显著性差异;低剂量组与模型组比较,低剂量组中也只有肝细胞脂肪变性这一个指标差异显著,其余病变指标均没有显著性差异;中、高两个剂量组分别与模型组比较,这两组大鼠的肝细胞坏死程度在加入受试样品后显著减轻,并且高剂量组大鼠的肝细胞脂肪变性也显著减轻。综上所述,与模型组相比,联苯双酯滴丸和不同剂量类胡萝卜素提取物对减轻肝细胞损伤均有不同程度的作用,表明法夫酵母类胡萝卜素提取物对大鼠化学性肝损伤有辅助保护作用。

据报道,CCl₄可通过影响细胞色素 P450,进而代谢产生活泼的自由基及一系列氧活性物并最终导致肝细胞死亡、肝组织生理生化指标发生异常变化^[27]。虾青素不仅具有增强免疫力以及抗炎^[28]等生物活性,而且具有很强的抗氧化^[29]、清除自由基^[30]的能力。推测法夫酵母类胡萝卜素提取物保护大鼠肝脏的原因可能为:通过虾青素等类胡萝卜素清除自由基,从而减少自由基对肝细胞膜上的磷脂分子的攻击,保护了细胞膜的完整性^[31-32]。同时通过清除自由基,减少自由基与肝细胞内大分子发生共价结合,减轻膜不饱和脂质的攻击,维持细胞膜的稳定性和通透性^[33],进而阻止了 ALT、AST 从细胞质中大量溢出。

3 结论

本试验结果表明,模型组的 ALT、AST 均高于正常组,肝细胞脂肪变性、气球样变、肝细胞坏死程度高于正常组,说明 CCl₄肝损伤模型造模成功。3 种不同剂量的法夫酵母类胡萝卜素提取物对肝病变都有不同程度的减轻,同时高剂量组大鼠血清 ALT 与模型组比较显著降低 ($P < 0.05$),表明法夫酵母类胡萝卜素提取物对大鼠肝脏有一定程度的保护作用。对法夫酵母类胡萝卜素提取物进行成分分析发现,其主要成分为虾青素。

[参 考 文 献]

- [1] 李天丽,蔡慧农,李利君,等. 法夫酵母虾青素合成途径相关基因的研究进展 [J]. 微生物学通报, 2013, 40(9): 1673-1685. DOI:10.13344/j. microbiol. china. 2013. 09. 017.
- [2] 肖安风,于广仁,蔡慧农,等. 法夫酵母发酵过程的 pH 值控制策略及对虾青素合成的影响 [J]. 中国食品学报, 2015, 15(1): 66-72. DOI:10.16429/j. 1009-7848. 2015. 01. 011.
- [3] DU X P, DONG C C, WANG K, et al. Separation and purification of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* by preparative high-speed counter-current chromatography [J]. Journal of Chromatography B, 2016, 1029/1030: 191-197. DOI:10.1016/j. jchromb. 2016. 06. 042.
- [4] 詹武兵. 酿酒酵母中红法夫酵母类胡萝卜素合成基因的克隆表达和 β -胡萝卜素代谢途径的构建 [D]. 无锡: 江南大学, 2013: 3-8.
- [5] ERIKSEN N T. Research trends in the dominating microalgal pigments, β -carotene, astaxanthin, and phycocyanin used in feed, in foods, and in health applications [J]. Journal of Nutrition & Food Sciences, 2016, 6(3): 1-6. DOI:10.4172/2155-9600.1000507.
- [6] 孙杰,胡奇,李世芬,等. 番茄红素的安全性评价及对小鼠免疫功能的影响 [J]. 食品科学, 2015, 36(9): 170-175. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201509031.
- [7] 李慧翔,伍菱,黄高凌,等. 法夫酵母 JMU-MVP14 菌株中类胡萝卜素成分分析 [J]. 激光生物学报, 2014, 23(3): 234-238. DOI:10.3969/j. issn. 1007-7146. 2014. 03. 008.
- [8] GIMSON A E. Fulminant and late onset hepatic failure [J]. British Journal of Anaesthesia, 1996, 77(1): 90-98. DOI: 10.1093/bja/77.1.90.
- [9] 杨康健. 缺氧诱导肝纤维化动物模型的建立 [D]. 西安: 第四军医大学, 2010: 15-18.
- [10] 孟庆华. 肝功能障碍病人的营养支持 [J]. 肠外与肠内营养, 2017, 24(4): 193-196. DOI:10.16151/j. 1007-810x. 2017. 04. 001.
- [11] 原子英,郭津生. 肝硬化相关免疫功能障碍的特点及其临床相关性 [J]. 中华肝脏病杂志, 2016, 24(10): 724-

727. DOI:10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2016.10.002.
- [12] 刘雪姣. 玉米低聚肽保肝作用的研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2016: 4-7.
- [13] 游莉. 咖啡酸苯乙酯衍生物对化学性肝损伤小鼠的保护作用 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014: 7-8.
- [14] 杨槐俊, 郭素萍, 薛莉. 冬虫夏草菌丝提取物对化学性肝损伤的辅助保护作用 [J]. 菌物学报, 2014, 33(2): 394-400. DOI:10.13346/j.mycosystema.130039.
- [15] 张睿, 陈金锋, 高家荣, 等. 疏肝健脾方对化学性肝损伤的保护作用 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(2): 140-143. DOI:10.13412/j.cnki.zyyl.2014.02.045.
- [16] 石立强. 高活性小牛血去蛋白提取物对化学性肝损伤的保护作用及其机制研究 [D]. 吉林: 北华大学, 2017: 1-4.
- [17] 刘三海. 垂盆草调节羟自由基减轻四氯化碳急性肝损伤机制的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2015: 23-25.
- [18] 罗慧英, 黄亚红, 朱丽娟, 等. 藏药藏麻对实验性酒精肝损伤小鼠的保护作用研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(10): 1107-1110.
- [19] SEMBA R D, LAURETANI F, FERRUCCI L. Carotenoids as protection against sarcopenia in older adults [J]. Archives of Biochemistry & Biophysics, 2007, 458(2): 141-145. DOI:10.1016/j.abb.2006.11.025.
- [20] BLESSINGTON T, NZARAMBA M N, SCHEURING D C, et al. Cooking methods and storage treatments of potato: effects on carotenoids, antioxidant activity, and phenolics [J]. American Journal of Potato Research, 2010, 87(6): 479-491. DOI:10.1007/s12230-010-9150-7.
- [21] CASTRO-LÓPEZ C, SÁNCHEZ-ALEJO E J, SAUCEDO-POMPA S, et al. Fluctuations in phenolic content, ascorbic acid and total carotenoids and antioxidant activity of fruit beverages during storage [J]. Heliyon, 2016, 2(9): e00152. DOI:10.1016/j.heliyon.2016.e00152.
- [22] MACDONALD C M, DOW J, MOORE M R. A possible protective role for sulphhydryl compounds in acute alcoholic liver injury [J]. Biochemical Pharmacology, 1977, 26(16): 1529-1531. DOI:10.1016/0006-2952(77)90428-2.
- [23] 许秀举, 李美仙, 吴玲. 甘草纤维素对试验动物化学性肝损伤保护功能研究 [J]. 食品科学, 2003, 24(8): 140-142. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2003.08.042.
- [24] 黄琼, 黄俊明, 陈瑞仪, 等. 大豆、枸杞子、山楂复合提取物对小鼠化学性肝损伤的保护作用 [J]. 营养学报, 2003, 25(2): 208-211. DOI:10.3321/j.issn:0512-7955.2003.02.032.
- [25] 张海燕, 温韬, 卢静, 等. 四氯化碳诱导大鼠慢性肝损伤模型方法的探讨 [J]. 实用肝脏病杂志, 2009, 12(3): 161-163. DOI:10.3969/j.issn.1672-5069.2009.03.001.
- [26] 王晓柠, 陶庆, 冯琴, 等. 一贯煎对CCl₄诱导的肝纤维化大鼠肝组织胶原代谢的影响 [J]. 中西医结合学报, 2011, 9(6): 651-656. DOI:10.3736/jcim20110612.
- [27] 刘芬. 白芍总苷对急性化学性肝损伤小鼠的保护作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(4): 100-102. DOI: 10.13412/j.cnki.zyyl.2015.04.031.
- [28] MIYACHI M, MATSUNO T, ASANO K, et al. Anti-inflammatory effects of astaxanthin in the human gingival keratinocyte line NDUSD-1 [J]. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 2015, 56(3): 171-178. DOI:10.3164/jcbrn.14109.
- [29] SINDHU S, SHERIEF P M, GEORGE S, et al. Antioxidant activity of natural astaxanthin extracted from shell of arabian red shrimp *aristeus alcocki* [J]. Fishery Technology, 2013(50): 1-7.
- [30] CHEW B P, PARK J S. Carotenoid action on the immune response [J]. Journal of Nutrition, 2004, 134(1): 257-261. DOI:10.1093/jn/134.1.257S.
- [31] OHTA Y, IMAI Y, MATSURA T, et al. Preventive effect of neutropenia on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats [J]. Journal of Applied Toxicology Jat, 2006, 26(2): 178. DOI:10.1002/jat.1122.
- [32] 陈伟. 木蹄蕨方水提物对四氯化碳肝损伤的保护作用及其机制 [D]. 上海: 第二军医大学, 2013: 9-10.
- [33] 邓媛. 桑枝总黄酮对肝损伤的保护作用及机制研究 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2017: 3-5.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)