

核桃蛋白多肽对脂多糖诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用

单春兰¹, 耿树香², 缪福俊², 宁德鲁²

(1. 云南农业大学 动物科学技术学院, 昆明 650201; 2. 云南省林业和草原科学院, 昆明 650204)

摘要: 构建脂多糖(LPS)诱导小鼠急性肝损伤模型, 研究核桃蛋白多肽(WPP)对肝损伤的保护作用。实验小鼠随机分为5组(空白对照组, LPS模型组, LPS+WPP低、中、高剂量组), 连续灌胃WPP 5周后, 采用尾静脉注射LPS诱导肝损伤, 检测各处理组小鼠肝脏指数、血清中谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)活性、肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性、组织病理学变化以及血清中炎症因子白细胞介素IL-1 β 和IL-6水平。结果表明: 与LPS模型组相比, WPP高剂量组肝脏指数显著降低($P < 0.05$), WPP中、高剂量组小鼠血清中ALT和AST活性极显著下降($P < 0.01$), WPP低、中、高剂量组小鼠血清中IL-1 β 和IL-6含量极显著下降($P < 0.01$), WPP中、高剂量组小鼠肝组织中SOD活性显著升高($P < 0.05$), WPP低、中、高剂量组小鼠肝组织中GSH-Px活性极显著升高($P < 0.01$); 组织病理学观察发现, WPP低、中、高剂量组小鼠肝组织病理损伤明显减轻。WPP对LPS造成的小鼠急性肝损伤具有明显的保护作用。

关键词: 核桃蛋白多肽; 脂多糖(LPS); 急性肝损伤; 炎症因子; 保护作用

中图分类号: TS229; TS201.4 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2021)04-0033-05

Protective effect of walnut protein polypeptide on LPS-induced acute liver injury in mice

SHAN Chunlan¹, GENG Shuxiang², MIAO Fujun², NING Delu²

(1. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Yunnan Academy of Forestry and Grassland, Kunming 650204, China)

Abstract: The model of acute liver injury induced by lipopolysaccharide (LPS) in mice was established to study the protective effect of walnut protein polypeptide (WPP) on liver injury. Mice were randomly divided into five groups (blank control group, LPS model group, LPS+WPP low-dose group, LPS+WPP medium-dose group and LPS+WPP high-dose group). After continuous administration of WPP for five weeks, LPS was injected into tail vein to induce liver injury. The liver index, serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity in liver tissue, histopathological changes, serum IL-1 β and IL-6 were detected. The results showed that compared with the LPS model group, the liver index of the mice in the WPP high-dose group was significantly reduced ($P < 0.05$), the ALT and AST activities in the serum of mice in the WPP medium and high-dose groups decreased extremely significantly ($P < 0.01$), the levels of IL-1 β and IL-6 in the serum of mice in the WPP low, medium and high-dose

groups decreased extremely significantly ($P < 0.01$), the SOD activities in the liver tissues of mice in the WPP medium and high-dose groups increased significantly ($P < 0.05$), and the GSH-Px activities in the liver tissues of mice in the WPP low, medium and high-dose groups increased extremely significantly ($P < 0.01$).

收稿日期: 2020-07-07; 修回日期: 2020-12-25

基金项目: 云南省重大科技专项(2018ZG003)

作者简介: 单春兰(1990), 女, 在读博士, 研究方向为分子病理学(E-mail) 13614470751@163.com。

通信作者: 缪福俊, 助理研究员, 硕士(E-mail) miaofujun@yeah.net; 宁德鲁, 研究员, 硕士(E-mail) ningdelu@163.com。

Histopathological observation showed that the pathological injury of the liver tissue in the WPP low, medium and high - dose groups was significantly reduced. WPP had obvious protective effect on LPS - induced acute liver injury in mice .

Key words:walnut protein polypeptide; lipopolysaccharide (LPS); acute liver injury; inflammatory factor; protective effect

肝脏是机体代谢和解毒的主要器官,在药物、乙醇、病毒、毒素、自身免疫或炎症等因素诱导下可引发肝损伤,严重时形成肝纤维化、肝硬化、肝癌等病变^[1-3]。当肝脏受损时,会加剧氧化应激反应和炎症因子的分泌,如白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等^[4-6]。近年来肝损伤的发病率越来越高,严重危害人类的健康,从天然产物中提取安全、低毒或无副作用的护肝成分已成为目前的研究热点^[7]。

核桃(*Juglans regia*)属胡桃科胡桃属植物,是世界四大干果之一,富含多种营养和药理成分,具有较高的营养价值和商业价值^[8]。核桃经压榨制油后会产生大量的饼粕,其蛋白质含量高达50%,是一种优质的蛋白质资源^[9-10]。核桃蛋白经蛋白酶水解后制备的多肽具有抗氧化、抗癌、免疫调节等多种生理活性^[11-12]。Ma等^[13]从核桃蛋白酶解液中分离获得一种核桃多肽 Cys-Thr-Leu-Glu-Trp (CTLEW),可诱导乳腺癌细胞 MCF-7 的凋亡和自噬。Li等^[14]采用胰蛋白酶水解获得的核桃蛋白水解物具备很强的抗氧化能力,能减轻氧化应激,抑制大脑中促炎细胞因子如 TNF- α 、IL-1 β 等的表达,对 D-半乳糖和氯化铝引起的神经毒性起保护作用。然而,核桃蛋白多肽对机体肝损伤是否会产生保护作用尚不清楚。脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性细菌内毒素的主要成分,可激发宿主免疫应答,激活哺乳动物的单核巨噬细胞产生大量炎症介质,直接或间接地对肝组织和细胞产生损伤作用^[15]。因此,本研究经口灌胃核桃蛋白多肽,利用 LPS 建立小鼠急性肝损伤模型,探究核桃蛋白多肽对肝损伤模型的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

核桃蛋白多肽(WPP),生产工艺见文献[16],由云南省木本油料工程中心提供。

50只雄性昆明小鼠(体重 (22 ± 2) g),购买于昆明医科大学(生产许可证号 SCXK(滇)K2015-

0002)。饲养条件:温度 (21 ± 2) °C,湿度 (45 ± 5) % ,自由进食和饮水,适应性饲养7d。

超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)试剂盒,南京建成生物科技有限公司;Mouse IL-6和IL-1 β ELISA 检测试剂盒,上海生工生物工程技术有限公司;脂多糖(LPS),Sigma-Aldrich 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

1.1.2 仪器与设备

Allegra 64R 超速冷冻离心机,美国 Beckman 公司;恒温水浴锅,昆明赛捷生物科技有限公司;ELx800™酶标仪,美国 BioTek 仪器有限公司;LEICA RM2135 石蜡切片机,德国 Leica 公司;BX43F 正置光学显微镜,日本奥林巴斯公司;L-8900 全自动氨基酸分析仪,日本 Hitachi 公司;Agilent-1100 高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 核桃蛋白多肽氨基酸含量和肽段相对分子质量分布测定

依据 GB 5009.124—2016《食品安全国家标准食品中氨基酸的测定》,采用全自动氨基酸分析仪对核桃蛋白多肽的氨基酸组成进行测定。依据 GB/T 22492—2008《大豆肽粉》,采用高效凝胶过滤色谱法测定核桃蛋白多肽中肽段相对分子质量分布。

1.2.2 动物分组与给药

将50只小鼠随机分为5组(见表1),即空白对照组,LPS模型组,WPP低、中、高剂量组,每组各10只。连续灌胃5周,每日2次。灌胃后常规饲养,自由饮水,保持饲养环境清洁。第36天尾静脉注射LPS造成急性肝损伤,禁食12h后称重,各组均取10只小鼠摘眼球血并分离血清,小鼠脱臼处死后,迅速解剖取出肝脏,用预冷的生理盐水清洗血液,滤纸吸干并称重,检测肝组织抗氧化指标,另取部分肝组织制作石蜡切片,HE染色进行组织病理学检查。

表1 小鼠分组情况

组别	处理	药物剂量/ (mg/kg)	LPS 剂量/ (mg/kg)
空白对照组	蒸馏水	0	0
LPS 模型组	蒸馏水	0	4
WPP 低剂量组	WPP	160	4
WPP 中剂量组	WPP	320	4
WPP 高剂量组	WPP	640	4

1.2.3 肝脏指数的计算

肝脏指数按式(1)计算。

$$c = m_1/m_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: c 为肝脏指数; m_1 为小鼠肝脏质量,g; m_0 为小鼠空腹质量,g。

1.2.4 生化指标测定

血清 ALT 和 AST 活性、IL-1 β 和 IL-6 含量测定:取小鼠眼球血清,按相应检测试剂盒检测。

SOD 和 GSH-Px 活性测定:称取肝左叶组织 0.5 g,于玻璃匀浆管内,加入 4.5 mL 生理盐水,研磨至组织匀浆化,得到质量分数约 10% 的肝匀浆,按 SOD 和 GSH-Px 试剂盒说明书检测。

1.2.5 肝组织病理的检查

取各处理组肝右叶 0.5 ~ 1 cm³ 于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h 后,经石蜡包埋后用切片机进行切片,厚度 5 μ m。按照脱蜡、水化、苏木精-伊红染色(HE)顺序,树胶封片后于光学显微镜下观察各组肝组织的病理学变化。

1.2.6 统计与分析

实验数据以“平均值 \pm 标准差”表示,采用 SPSS 23.0 统计软件的 ANOVA 程序进行单因素方差分析,采用邓肯氏法(Duncan)进行多重比较检验, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与讨论

2.1 核桃蛋白多肽氨基酸含量与肽段相对分子质量分布

核桃蛋白多肽中游离氨基酸含量如表 2 所示。

表2 WPP 中游离氨基酸含量 mg/100 g

氨基酸	含量	氨基酸	含量
亮氨酸(Leu)	1 009.45	缬氨酸(Val)	87.50
谷氨酸(Glu)	489.26	脯氨酸(Pro)	68.95
苯丙氨酸(Phe)	365.18	甘氨酸(Gly)	45.35
精氨酸(Arg)	180.35	组氨酸(His)	28.41
蛋氨酸(Met)	172.08	酪氨酸(Tyr)	23.55
丙氨酸(Ala)	152.55	苏氨酸(Thr)	16.69
赖氨酸(Lys)	117.94	丝氨酸(Ser)	9.91
异亮氨酸(Ile)	112.57	半胱氨酸(Cys)	3.20
天冬氨酸(Asp)	101.45		

由表 2 可知:核桃蛋白多肽中亮氨酸含量最高,为 1 009.45 mg/100 g,其次是谷氨酸、苯丙氨酸、精氨酸等;含量最少的为丝氨酸和半胱氨酸,含量在 10 mg/100 g 以下。

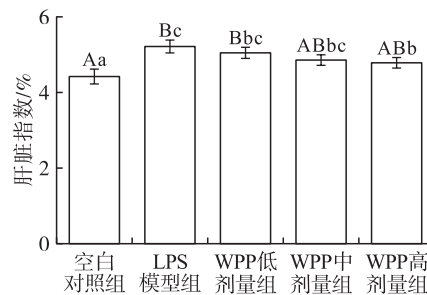
核桃蛋白多肽中肽段相对分子质量分布如表 3 所示。

表3 WPP 中肽段相对分子质量分布

相对分子质量/Da	占比/%
>3 000	0.21
[3 000 ~ 2 000]	0.69
(2 000 ~ 1 000]	4.72
(1 000 ~ 500]	20.55
(500 ~ 180]	50.95
<180	22.88

由表 3 可知,核桃蛋白多肽肽段相对分子质量主要在 3 000 Da 以内,占 99.79%。其中,小于 1 000 Da 的占 94.38%,小于 500 Da 的占 73.83%。

2.2 核桃蛋白多肽对小鼠肝脏指数的影响(见图 1)



注:不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$),不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同

图1 WPP 对小鼠肝脏指数的影响

LPS 是最常采用构建小鼠急性肝损伤动物模型的方法之一,LPS 可引起肝损伤导致肝脏肿大,从而使肝脏质量增加。由图 1 可知,与空白对照组相比,LPS 模型组小鼠的肝脏指数极显著增大($P < 0.01$),表明 LPS 导致了小鼠肝脏肿大,使肝脏指数增高,造模成功。与 LPS 模型组相比,WPP 低、中、高剂量组小鼠肝脏指数均有所降低,WPP 高剂量组差异显著($P < 0.05$),表明 WPP 对肝脏具有一定的保护作用。

2.3 核桃蛋白多肽对小鼠血清 ALT 和 AST 活性的影响(见表 4)

ALT 和 AST 均为肝细胞中的非特异性细胞内功能酶,是临床上常用的肝功能评价指标,当肝细胞发生损伤时,会被释放到血液中^[17-18]。由表 4 可知:与空白对照组相比,LPS 模型组小鼠血清 ALT 和 AST 活性极显著升高($P < 0.01$),说明肝细胞发生了损伤;与 LPS 模型组相比,WPP 低、中、高剂量

组小鼠血清 ALT 和 AST 活性均有所下降,中、高剂量组 ALT 和 AST 活性极显著低于 LPS 模型组 ($P < 0.01$);WPP 中、高剂量组小鼠血清 ALT 活性极显著低于 WPP 低剂量组 ($P < 0.01$);WPP 高剂量组小鼠血清 AST 活性显著低于 WPP 低剂量组 ($P < 0.05$);WPP 高剂量组与低剂量组相比,ALT 及 AST 活性分别降低了 16.38% 和 15.46%。结果表明 LPS 造模成功,WPP 有明显的保肝功效,且呈剂量依赖性。

表 4 WPP 对小鼠血清 ALT 和 AST 活性的影响 U/L

组别	ALT 活性	AST 活性
空白对照组	21.29 ± 0.97Aa	36.30 ± 1.43Aa
LPS 模型组	35.60 ± 1.57Cc	61.23 ± 3.33Cd
WPP 低剂量组	32.84 ± 1.66Cc	54.73 ± 2.65BCc
WPP 中剂量组	28.69 ± 0.83Bb	48.65 ± 2.05Bbc
WPP 高剂量组	27.46 ± 1.17Bb	46.27 ± 3.62Bb

2.4 核桃蛋白多肽对小鼠血清 IL-1 β 和 IL-6 水平的影响(见表 5)

表 5 WPP 对小鼠血清 IL-1 β 和 IL-6

组别	水平的影响	
	IL-1 β 含量	IL-6 含量
空白对照组	4.06 ± 0.19Aa	11.69 ± 0.41Aa
LPS 模型组	6.67 ± 0.17Dd	16.82 ± 0.38Cd
WPP 低剂量组	5.66 ± 0.22Cc	15.09 ± 0.27Bc
WPP 中剂量组	4.83 ± 0.13 Bb	14.33 ± 0.29Bb
WPP 高剂量组	4.57 ± 0.10Ab	14.18 ± 0.23 Bb

LPS 能随血液进入肝脏后引发氧化应激和炎症反应,形成肝损伤^[15]。由表 5 可知,与空白对照组相比,LPS 模型组小鼠血清炎症因子 IL-1 β 和 IL-6 含量极显著升高 ($P < 0.01$)。与 LPS 模型组相比,WPP 低、中、高剂量组 IL-1 β 和 IL-6 含量极显著下降 ($P < 0.01$)。WPP 中、高剂量组 IL-1 β 含量极显著低于 WPP 低剂量组 ($P < 0.01$),IL-6 含量

显著低于 WPP 低剂量组 ($P < 0.05$)。结果表明 WPP 降低了 LPS 诱导的肝损伤小鼠血清中炎症因子表达的能力。

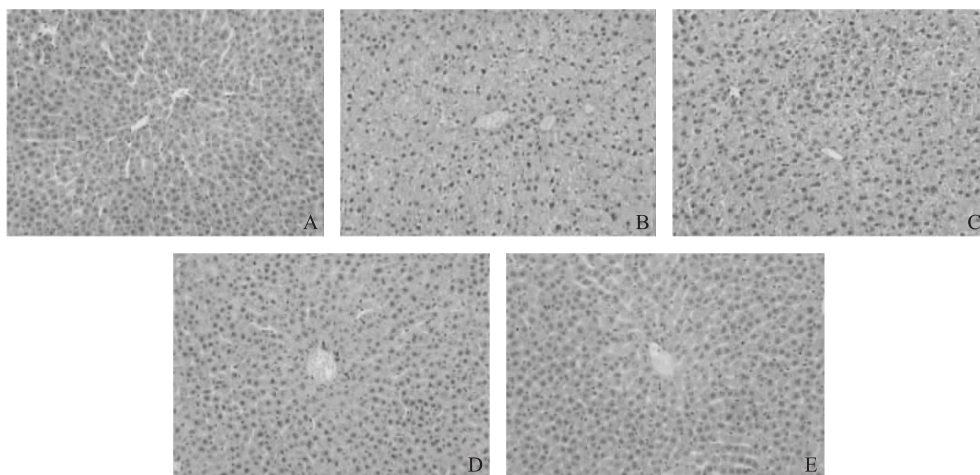
2.5 核桃蛋白多肽对小鼠肝组织中 SOD 和 GSH-Px 活性的影响(见表 6)

表 6 WPP 对小鼠肝组织中 SOD

组别	及 GSH-Px 活性的影响	
	SOD 活性	GSH-Px 活性
空白对照组	214.12 ± 12.95Aa	481.96 ± 13.93Aa
LPS 模型组	153.97 ± 11.23Bc	324.91 ± 21.76Dc
WPP 低剂量组	173.13 ± 14.70Bbc	376.83 ± 12.75Cbc
WPP 中剂量组	180.73 ± 3.32 Bb	392.55 ± 19.30BCb
WPP 高剂量组	184.49 ± 15.46ABb	429.15 ± 15.58Bb

生物机体抗氧化酶系统中 SOD 和 GSH-Px 的活性高低间接反映了机体清除自由基能力的强弱^[19]。由表 6 可知,与空白对照组相比,LPS 模型组小鼠肝组织中的 SOD 和 GSH-Px 活性极显著下降 ($P < 0.01$),表明 LPS 致肝损伤后,会降低肝组织中 SOD 和 GSH-Px 的活性。与 LPS 模型组相比,WPP 低、中、高剂量组小鼠肝组织中的 SOD 和 GSH-Px 活性有所上升,WPP 中、高剂量组小鼠肝组织中 SOD 活性显著高于 LPS 模型组 ($P < 0.05$);WPP 低、中、高剂量组小鼠肝组织中的 GSH-Px 活性极显著高于 LPS 模型组 ($P < 0.01$);WPP 高剂量组与低剂量组相比,SOD 和 GSH-Px 活性分别升高了 6.56% 和 13.88%。表明 WPP 能显著增强肝组织中 SOD 和 GSH-Px 活性,提高肝脏抗氧化系统的能力。这与 Zou 等^[20]研究发现的核桃蛋白多肽可以提高 A β 25-35 诱导的阿尔茨海默症小鼠体内抗氧化能力,从而起到脑部保护作用的结果相似。

2.6 核桃蛋白多肽对小鼠肝组织病理变化的影响(见图 2)



注:A. 空白对照组;B. LPS 模型组;C. WPP 低剂量组;D. WPP 中剂量组;E. WPP 高剂量组。

图 2 WPP 对小鼠肝组织病理变化的影响(HE × 100)

由图2可知:空白对照组小鼠肝小叶结构清晰,无病理组织学变化;与空白对照组比较,LPS模型组肝索排列紊乱,中央静脉扩大有淤血,肝细胞发生严重的细胞肿胀,汇管区见炎症细胞浸润;与LPS模型组比较,WPP低、中、高剂量组肝细胞病变明显改善,炎症细胞浸润减少,且高剂量组改善效果最好。结果表明WPP可改善肝组织结构病理损伤程度,保护效果与给药剂量呈正相关。

3 结论

核桃蛋白多肽能够降低LPS诱导的急性肝损伤小鼠血清中ALT和AST活性及炎症因子(IL-1 β 和IL-6)水平,提高肝组织中SOD和GSH-Px活性,改善肝组织病变情况。提示预先口服WPP可增强机体抗氧化活性,减轻炎症反应,达到保护肝脏的目的。但是本研究对核桃蛋白多肽保护肝脏的具体分子机理尚不清楚,还有待进一步深入开展研究。

参考文献:

- [1] VEGA M, VERMA M, BESWICK D, et al. The incidence of drug - and herbal and dietary supplement - induced liver injury: preliminary findings from gastroenterologist - based surveillance in the population of the state of delaware[J]. Drug Safety, 2017, 40(9): 783 - 787.
- [2] 程浩, 潘静, 姚甜甜, 等. 全身炎症反应导致肝损伤的临床特点和机制研究现状[J]. 国际病毒学杂志, 2019, 26(5): 354 - 357.
- [3] REAL M, BARNHILL M S, HIGLEY C, et al. Drug - induced liver injury: highlights of the recent literature[J]. Drug Safety, 2019, 42(3): 365 - 387.
- [4] CZAJA M J. Cell signaling in oxidative stress - induced liver injury[J]. Semin Liver Dis, 2007, 27(4): 378 - 389.
- [5] LI S, HONG M, TAN H Y, et al. Insights into the role and interdependence of oxidative stress and inflammation in liver diseases[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016(1 - 3): 1 - 21.
- [6] MARK W R, CATHAL H, CLIONA O. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis[J]. Cell Mol Immunol, 2016, 13(3): 267 - 276.
- [7] XU G B, XIAO Y H, ZHANG Q Y, et al. Hepatoprotective natural triterpenoids [J]. Eur J Med Chem, 2018, 154(10): 691 - 716.
- [8] HAYES D, ANGOVE M J, TUCCI J, et al. Walnuts (*Juglans regia*) chemical composition and research in human health[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2016, 56(8): 1231 - 1241.
- [9] 金子纯, 张润光, 韩军岐, 等. 核桃饼粕蛋白质及其开发利用[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(6): 265 - 270.
- [10] 张庆祝, 丁晓雯, 陈宗道, 等. 核桃蛋白质研究进展[J]. 粮食与油脂, 2003(5): 21 - 23.
- [11] LI X, GUO M, CHI J, et al. Bioactive peptides from walnut residue protein[J]. Molecules, 2020, 25(6): 1285 - 1298.
- [12] LI Y, YU J. Research progress in structure - activity relationship of bioactive peptides[J]. J Med Food, 2014, 18(2): 147 - 156.
- [13] MA S, HUANG D, ZHAI M, et al. Isolation of a novel bio - peptide from walnut residual protein inducing apoptosis and autophagy on cancer cells [J]. BMC Complem Altern M, 2015, 15(1): 413 - 427.
- [14] LI F, WANG X J, PENG F, et al. Walnut protein hydrolysates play a protective role on neurotoxicity induced by D - galactose and aluminum chloride in mice [J]. Molecules, 2018, 23(9): 2308 - 2322.
- [15] BOUCHON A, FACCHETTI F, WEIGAND M A, et al. TREM - 1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock[J]. Nature, 2001, 410(6832): 1103 - 1107.
- [16] 缪福俊, 耿树香, 王洋, 等. 核桃蛋白(肽)粉生产工艺实践[J]. 中国油脂, 2019, 44(3): 138 - 140.
- [17] WANG M, SUN J G, JIANG Z H, et al. Hepatoprotective effect of kaempferol against alcoholic liver injury in mice[J]. Am J Chin Med, 2015, 43(2): 241 - 254.
- [18] STEPHEN D R. Clinical assessment of liver disease[J]. Medicine, 2011, 39(9): 507 - 510.
- [19] SELVARATNAM J S, ROBAIRE B. Effects of aging and oxidative stress on spermatozoa of superoxide - dismutase 1 - and catalase - null mice[J]. Biol Reprod, 2016, 95(3): 60 - 72.
- [20] ZOU J, CAI P S, XIONG C M, et al. Neuroprotective effect of peptides extracted from walnut (*Juglans sigilata* Dode) proteins on Abeta25 - 35 - induced memory impairment in mice[J]. J Huazhong Univ Sci Technol, 2016, 36(1): 21 - 30.