

大蒜素对二甲基甲酰胺致小鼠急性肝损伤的预防作用

邢国振, 贾凤兰, 阮明, 张宝旭*

(北京大学公共卫生学院毒理学系, 北京 100083)

摘要: 目的 研究大蒜素对二甲基甲酰胺 (N, N-dimethylformamide, DMF) 致小鼠急性肝损伤的预防作用。方法 采用 DMF 致小鼠急性肝损伤模型, 染毒 48 h 后, 测定血清中丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 的活性; 留取肝脏组织, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜观察肝脏组织病理变化; 制备肝匀浆, 测定肝中还还原型谷胱甘肽 (GSH)、氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 和丙二醛 (MDA) 的含量。结果 与正常组比较, 模型组小鼠血清中 ALT、AST 和 LDH 活性明显升高, 肝脏组织出现明显的肝细胞变性坏死; 大蒜素各剂量组小鼠血清中 ALT、AST 和 LDH 活性与模型组比较显著降低, 肝脏组织病理损伤明显减轻, GSH/GSSG 比值增高, MDA 含量下降。结论 大蒜素对 DMF 引起的小鼠急性肝损伤具有明显的预防作用。

关键词: 大蒜素; 二甲基甲酰胺; 急性肝损伤

中图分类号: R994.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2008)03-0144-04

Protective effect of allicin on acute liver injury induced by N, N-dimethylformamide

XING Guozhen, JIA Fenglan, RUAN Ming, ZHANG Baoxu

(Department of Toxicology, School of Public Health, Beijing University, Beijing 100083, China)

Abstract: Objective To study the preventive effect of allicin on acute liver injury induced by N, N-dimethylformamide (DMF) in mice. Methods An experimental hepatoxic injury model was made by injection of DMF to investigate the preventive effect of allicin. The dosages of allicin used in this experiment were 7.5, 15, 30 mg/kg for 5 days; the DMF (2.8 g/kg) was given 30 min later after allicin administration at the 4th day. 48 h later after injection of DMF, the serum were taken for the measurement of the activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH), and the liver tissues were taken for histopathological examination (HE staining) by light microscope. The ratio of GSH/GSSG and the content of malondialdehyde (MDA) in liver homogenates were also detected at the same time. Results The results showed that administration of DMF, the serum activities of ALT, AST and LDH were significantly increased, and the degeneration and necrosis could be seen in liver tissue. While in allicin pretreated group, the serum activities of these enzymes were dominantly lower than that of DMF group, the histopathological changes in liver were also significantly ameliorated after pretreatment of allicin. Additionally, the ratio of GSH/GSSG in liver homogenate was also increased, the contents of MDA, however, was markedly reduced as well in all allicin pretreated. Conclusion Allicin has definite preventive effect against DMF-induced acute hepatoxic injury in mice.

Key words: Allicin; N, N-dimethylformamide; Acute liver injury

二甲基甲酰胺 (N, N-dimethylformamide, DMF) 作为一种良好的有机溶剂, 广泛应用于纤维、皮革、染料及制药等工业生产中, 随着现代工业的发展, DMF 使用量逐年增加, DMF 中毒事故也屡见不鲜^[1-4]。急性中毒发生原因多数由于生产故障、设备漏裂或在检修设备时未采取有效的防护措施, 大量接触 DMF 蒸气所致。主要表现为消化系统症状, 以肝损害最明显, 血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 活性增高^[5], 碱性磷酸酶活

性增高和血浆胆碱酯酶活性轻度增高, 肝细胞脂肪变性和坏死^[6]。目前对 DMF 中毒尚无特效解毒剂, 因此, 开发拮抗 DMF 所致肝脏损伤的药物尤为重要。

大蒜素 (allicin) 是大蒜中主要活性成分之一, 具有抗炎、抗病毒、抗氧化、增强免疫以及降压、降血脂等作用。目前临床上应用的大蒜素主要有大蒜素肠溶片、大蒜素胶丸剂和大蒜素注射液 3 种, 可治疗菌痢和肠炎, 亦用于肺部和消化道白色念珠菌等真菌感染。本研究通过 DMF 导致的急性肝损伤模型检测了大蒜素对 DMF 引起的急性肝损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 药品与仪器

大蒜素 (三硫二丙烯, 化学结构式见图 1) 为几乎无色或淡黄色澄清液体, 具蒜臭, 纯度 98.2%,

收稿日期: 2007-12-28 修回日期: 2008-03-03

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (7072042)

作者简介: 邢国振 (1980-), 男, 硕士研究生, 研究方向为药物毒理学。

*: 通讯作者, 教授, 主要研究方向为毒理学。Tel: 010-82801527 E-mail: bxzhang@bjnu.edu.cn

密度 1.108 g/ml,折光率 1.587,江苏清江药业有限公司提供(批号:061129),用时以玉米油配成;DMF:ACROS公司提供(批号:A018522301),用生理盐水配制;还原型谷胱甘肽(reduced glutathione:GSH)和N-乙基顺丁烯二酰亚胺(N-ethylmaleimide:NEMI),上海丽珠东风生物技术有限公司出品;氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione:GSSG),北京红星生化技术公司出品;邻苯二甲醛(O-Phthalaldehyde:OPT),北京金龙化学试剂有限公司出品;0.8%硫代巴比妥酸(TBA),ACROS公司提供。HI-TACHI7170A型全自动生化分析仪,HI-TACHI公司生产;日本NIKON公司,E400显微镜系统,DXM1200F型摄像系统;751分光光度计。

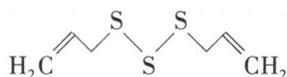


图 1 大蒜素的化学结构

1.2 动物分组及处理

1.2.1 实验动物 健康 ICR小鼠(清洁级)60只,雄性,起始体重 22~24 g,由北京大学医学部实验动物中心提供[SYXK(京)2002-0002]。实验前5只一笼饲养3d以适应环境。动物室和实验室温度为(23±2)℃,自动通风,明暗周期12h/12h,自由摄食饮水。饲料为北京大学医学部实验动物中心提供的普通饲料。

1.2.2 动物分组及处理 将60只小鼠随机分为6组:正常对照组、大蒜素(30 mg/kg)组、DMF染毒组、DMF染毒+3个剂量大蒜素预防性给药组(7.5、15和30 mg/kg),每组10只,每天上午8:00~9:00皮下给予小鼠大蒜素,各组小鼠每天给药时间相同;共5d,每天1次,其他组皮下给予等体积玉米油。给药第4天除对照组和大蒜素组外,染毒组和3个预防性给药组经腹腔(ip)给予DMF(2.8 g/kg)。DMF染毒48h后,所有动物内眦静脉取血,制备血清用于ALT、AST和乳酸脱氢酶(LDH)的检测。脱臼处死,立即解剖取肝脏,称重。留取50 mg肝组织匀浆用于GSH、GSSG和丙二醛(malondialdehyde:MDA)的测定;将肝左叶浸于10%甲醛溶液中固定,进行常规病理切片,HE染色,光镜下观察病理组织学变化。

1.3 生化分析和病理学分析

使用7170A自动生化分析仪分析血清中ALT、AST和LDH活性(由北京大学第三医院检验科测定)。用改良Hission方法^[7]分析GSH和GSSG的含量,并计算两

者的比值(GSH/GSSG)。肝脏中MDA含量用TAB反应法^[8]检测。

1.4 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS11.0软件包对各组间进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对小鼠体重、肝重和肝体比的影响

与对照组比较,大蒜素组小鼠体重略有下降,肝重和肝体比无变化;DMF染毒组体重下降,肝重变化不明显,肝体比略有增加;大蒜素预防性给药3个剂量组与DMF组比较,体重有所下降,肝重和肝体比变化不明显(表1)。

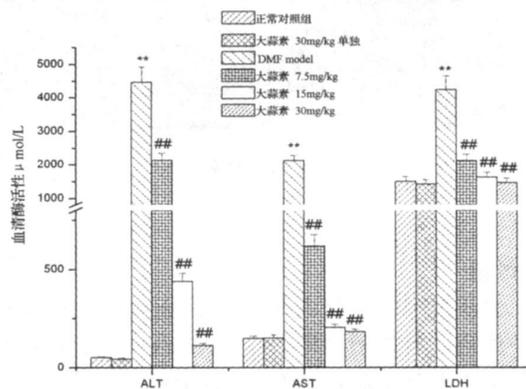
表 1 大蒜素对正常小鼠与DMF染毒小鼠体重、肝重和肝体比的影响

组别	体重(g)	肝重(g)	肝体比(×100)
对照组	28.4±1.8	1.85±0.22	6.50±0.44
大蒜素组	26.4±1.4*	1.63±0.21	6.01±0.52
DMF组	26.3±1.5*	1.90±0.23	7.20±0.68
大蒜素 7.5 mg/kg 预防组	27.0±2.6*#	2.00±0.32	7.36±0.52
大蒜素 15 mg/kg 预防组	25.9±1.6**##	1.84±0.22	7.09±0.53
大蒜素 30 mg/kg 预防组	24.9±3.0**##	1.67±0.35	6.69±1.13

与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与DMF染毒组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

2.2 对小鼠血清中ALT、AST和LDH活性的影响

与对照组比较,大蒜素组小鼠血清ALT、AST和LDH活性与正常水平接近;DMF组ALT、AST和LDH活性显著升高;大蒜素预防性给药3个剂量组与DMF组比较,血清中ALT、AST和LDH活性显著降低,且存在剂量反应关系($r = -0.846$, $P < 0.05$),大蒜素高剂量组血清酶活性已经接近正常水平(图2)。



与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与DMF模型组比较,## $P < 0.01$

2.3 对小鼠肝脏GSH/GSSG比值和MDA的影响

与对照组比较,DMF染毒组小鼠肝GSH/GSSG

比值无明显变化;大蒜素预防性给药 3 个剂量组与 DMF组比较,肝 GSH/GSSG比值增加;大蒜素组与 DMF组比较差异有统计学意义。

与对照组比较,大蒜素组肝 MDA含量明显下降,DMF组小鼠肝 MDA含量明显增加;大蒜素预防性给药 3 个剂量组与 DMF组比较,肝中 MDA含量显著下降至正常水平(表 2)。

表 2 大蒜素对正常小鼠与 DMF染毒小鼠肝 GSH/GSSG 比值和 MDA含量的影响

组别	GSH/GSSG	MDA ($\mu\text{g/g}$)
对照组	6.15±0.97	0.355±0.203
大蒜素组	6.69±2.62	0.112±0.097* ^{##}
DMF组	6.55±1.30	0.688±0.435*
大蒜素 7.5 mg/kg 预防组	7.60±2.01	0.307±0.218* ^{##}
大蒜素 15 mg/kg 预防组	6.87±2.96	0.291±0.080 ^{##}
大蒜素 30 mg/kg 预防组	8.65±1.96* ^{##}	0.266±0.109 ^{##}

与对照组比较, * P<0.05 与 DMF模型组比较, ^{##}P<0.05 ^{###}P<0.01

2.4 对肝组织病理组织学的影响

对照组小鼠肝脏颜色正常,红褐色、湿润,有光泽,富于弹性;光学显微镜下可见肝小叶轮廓清晰,肝细胞胞质丰富,含嗜碱性物质较多,核大而圆,核仁清晰(图 3. A)。大蒜素组小鼠肝脏大体和切片表现均接近正常对照组(图 3. B)。DMF组肝脏大体主要表现为灰黄色点状坏死灶,分布尚均匀,表面无光泽,质地稍脆,光学显微镜观察肝脏切片可见肝脏小叶中央静脉周围细胞坏死,且轮廓不清,胞核固缩或已溶解破碎,肝细胞索正常形态破坏,中间带可见细胞空泡样变及炎症细胞浸润(图 3. C)。大蒜素不同剂量预防组肝脏大体和切片与 DMF组相比有明显改善(图 3. D E F),随着大蒜素剂量的增加,肝细胞变性、肿大等病理损伤逐渐减轻,肝细胞索形态逐渐恢复,30 mg/kg 大蒜素预防组的肝脏组织结果已经接近正常对照组(图 3. F)。

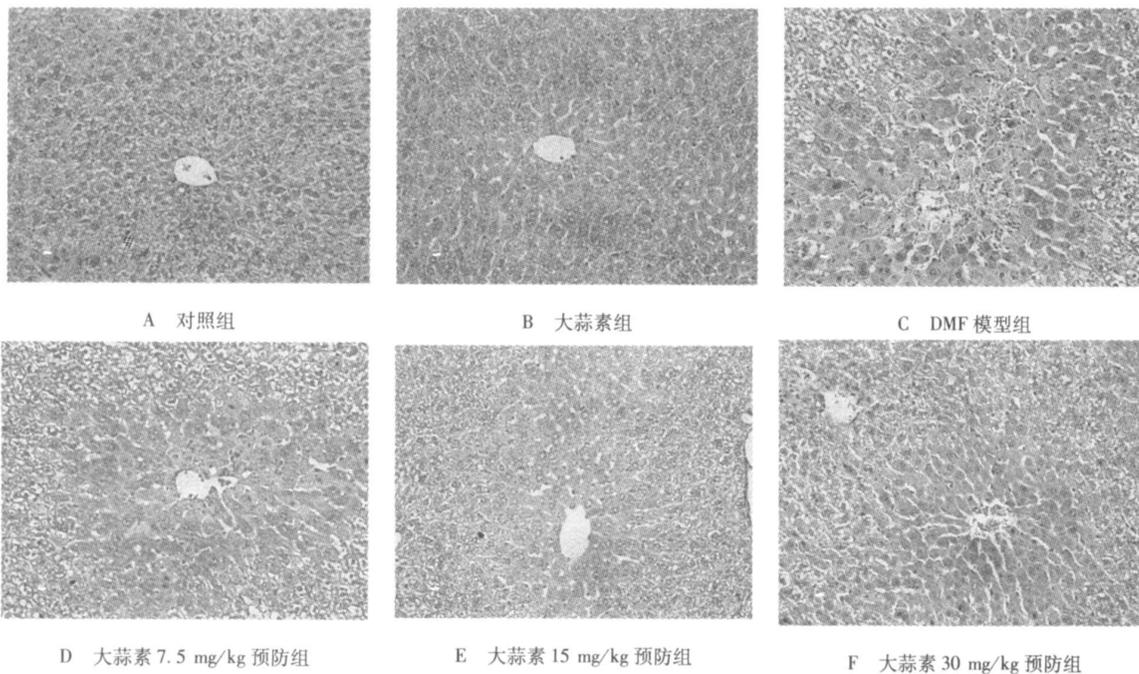


图 3 各组肝组织病理图片

3 讨论

大蒜素对四氯化碳等^[9-11]致小鼠急性肝损伤的保护作用已有报道,但对于 DMF致小鼠急性肝损伤的预防作用至今未见报道。本研究结果表明,小鼠给予 DMF 48 h后,体重明显下降,血清中 ALT AST 和 LDH活性显著升高,肝脏组织出现明显的肝细胞变性坏死,提示 DMF已对小鼠造成严重的肝损伤。DMF确切的中毒机制尚未完全阐明,但有学者认为

酯(NMF)有关^[12],当 NMF大量生成时,一部分和肝细胞大分子结合,破坏其结构和功能,造成肝细胞损伤;另一部分可和 GSH结合生成 S-(N甲基氨甲酰)谷胱甘肽(SMG),最后再转化为巯基尿酸(AMCC)而排出体外。急性 DMF中毒还与体内的氧化-抗氧化酶系的平衡状态^[13]、钙超载引起的线粒体损伤^[14]以及这些过程中产生过多活性氧有关。

此次研究表明,预防性给予大蒜素可显著降低 DMF中毒导致的血清 ALT AST和 LDH活性升高,

肝脏病理表现也有明显改善,表明预防性给药对DMF所致的小鼠急性肝损伤具有明显的预防作用。Miron等^[15]认为大蒜素在体内主要是提供巯基,促进GSH生成。本次研究观察到预防性给药可以降低肝脏MDA含量,提高GSH/GSSG比值,说明大蒜素对DMF致肝损伤的预防作用是通过GSH实现的。但本研究没有观察到模型组GSH和GSSG的明显变化,可能是48h的观察终点DMF组肝细胞中的谷胱甘肽变化已恢复之故^[19]。

大蒜素作为一种天然的护肝、抗氧化剂,在对DMF引起的急性肝损伤保护作用中具有一定的开发潜力。本研究为指导DMF接触人群强化服用含有大蒜素的食物进行中毒预防提供了一定的理论依据。

参考文献:

[1] 杨水莲,周蓓颖,江朝强,等.职业性急性二甲基甲酰胺中毒的临床分析[J].中国工业医学杂志,2000 13(4):212-214
 [2] 张国权.二甲基甲酰胺急性中毒68例临床分析[J].现代中西医结合杂志,2005 14(6):776-777.
 [3] 林丽婵.77例急性二甲基甲酰胺中毒的护理体会[J].中国职业医学,2003 30(3):64-65
 [4] 何坚,胡建辉,陈华宜.一起职业性急性二甲基甲酰胺中毒事故分析[J].中国职业医学,2003 30(6):58
 [5] Hurtu ME, McCooey K T, Placke ME, et al. Ten-day repeated exposure inhalation study of dimethylformamide (DMF) in cynomolgus monkeys [J]. Toxicol Lett 1991 59 (1-3): 229-237.
 [6] Senoh H, Katagiri T, Arita H, et al. Toxicity due to 2- and 13-wk

inhalation exposures of rats and mice to N,N-dimethylformamide [J]. Occup Health 2003 45 (6): 365-375.
 [7] 沈惠麒,赵利英,曲青山,等.组织中谷胱甘肽的荧光测定法[J].中华劳动卫生职业病杂志,1988 6(2):103-108
 [8] 庞战军,周玫,陈瓊.自由基医学研究方法[M].北京:人民卫生出版社,2000 62-64
 [9] 李安民,王艾丽,田辉.大蒜素对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的影响[J].湖北预防医学杂志,2000 11(5):29-30
 [10] 郑敏,阮慧琳,王智勇.大蒜素及葛花露对扑热息痛所致小鼠肝损伤的保护作用[J].咸宁医学院学报,2001 15(1):29-31
 [11] Huang Jie an, Ding Hong. Protective effects of allicin on hepatic damage induced by ethanol [J]. World Chinese Journal of Digestology 1999 7 (5): 427.
 [12] Seiji K, Inoue Q, Cai SX, et al. Increase in sister chromatid exchange rates in association with occupational exposure to N,N-dimethylformamide [J]. Int Arch Occup Environ Health 1992 64 (1): 65-67
 [13] 邱俏檬,缪心军,卢中秋,等.二甲基甲酰胺对小鼠肝功能、氧化酶及抗氧化酶的影响[J].温州医学院学报,2006 36(3):198-201.
 [14] 阙宝甜,乔赐彬.二甲基甲酰胺对肝脏钙稳态影响的实验研究[J].中国公共卫生学报,1997 16(3):180-182
 [15] TMIon, T Berovicij, A Rabinkov, et al. [³H] Allicin Preparation and applications [J]. Analytical Biochemistry 2004 331(2):364-369.
 [16] 郭凤华,穆进军,姚汝琳.二甲基甲酰胺急性肝损伤与肝脏谷胱甘肽的关系[J].中华劳动卫生职业病杂志,2001 19(6):424-426

FGC-A+肺功能测试仪

FGC-A+型全自动肺功能测试仪采用先进的微电脑处理系统,通过呼吸流量传感器,测量出人体的呼气功能和吸气功能,再经过分析、处理,由液晶显示器(LCD)显示和图形打印机打印结果。可以同时检测出人体的用力肺活量、肺活量、最大通气量、气道阻力、小气道状况等方面的数据及其曲线,并对受测者的肺功能障碍进行自动分型。



测量参数

- 肺活量测定: VC, TV, ERV, IRV, IC, MV, RR
- 用力肺活量测定: FVC, FEV.1, FEV.2, FEV.3, PEF, V75, V50, V25, V50/V25, V25/H
- 最大通气量测定: MVV, BSA, MVV/BSA
- 气道反应性实验
- 支气管扩张剂使用前

使用范围

- 各级医院呼吸内科、胸外科、肺科、气管炎专科临床医师的必备仪器
- 广泛应用于职防所、疾病预防控制中心的职业病普查、劳动能力鉴定
- 运动呼吸生理、病理的科研教学

安徽电子科学研究所医电一部

地址:安徽省合肥市高新技术产业开发区天波路五号
 电话:0551-5323761 5318719 13705694355
 邮编:230088
 网址:www.ahdzs-yidian.com www.ahdzs.com.cn
 E-mail:service@ahdzs-yidian.com