· 实验研究 ·

D – 柠檬烯对酒精性肝损伤大鼠铁过载调节作用*

孙婷婷[1], 梁惠[1], 刘颖[2], 王文成[1], 戈娜[3], 刘靖靖[1]

摘　要: 目的　建立酒精性肝损伤大鼠模型, 探讨右旋柠檬烯(D – 柠檬烯)对酒精性肝损伤大鼠铁过载的调节作用。**方法**　70 只 Wistar 雄性大鼠, 适应性喂养 7 d, 随机分为 7 组, 每组 10 只, 即对照组、模型组(酒精性肝损伤)、柠檬烯低、中、高剂量组(100、200、400 mg/kg)、柠檬烯对照组(400 mg/kg)、甘利欣组, 给药 6 周后处死大鼠; 苏木素 – 伊红(HE)染色观察肝组织形态结构; 透射电镜观察肝脏超微结构变化, 电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)测大鼠肝脏内铁含量(LIC); 酶联免疫吸附法测血浆铁调素(HEPC)、铁蛋白(SF)和血幼素(HJV)水平。**结果**　HE染色结果显示, 模型组大鼠肝小叶结构紊乱, 肝组织呈弥漫性大泡性脂肪变性, 肝小叶纤维组织增生明显, 可见点灶状坏死; 与模型组比较, 柠檬烯组大鼠肝小叶结构紊乱程度、肝细胞脂肪变性程度和损害程度明显减轻; 透射电镜结果显示, 与模型组比较, 柠檬烯组大鼠肝内质网、线粒体结构均有明显改善, 脂滴明显减少; 与对照组比较, 模型组大鼠 LIC、SF 水平[分别为(279.14 ± 5.87) μg/mL、(57.76 ± 5.83) ng/mL]升高, HEPC、HJV 含量[分别为(61.85 ± 4.85)、(46.21 ± 5.24) ng/mL]降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 高剂量柠檬烯组大鼠 LIC、SF 水平[分别为(180.14 ± 5.76) μg/mL、(35.39 ± 3.94) ng/mL]明显降低, HEPC、HJV 含量[分别为(81.36 ± 4.8)、(67.29 ± 5.89) ng/mL]明显升高($P < 0.05$)。**结论**　D – 柠檬烯对慢性酒精暴露大鼠肝脏损害所致铁过载具有一定拮抗作用。

关键词: 右旋柠檬烯(D – 柠檬烯); 酒精性肝损伤; 铁过载; 肝脏铁浓度(LIC); 铁调素(HEPC); 铁蛋白(SF); 血幼素(HJV)

中图分类号: R 931.71; R 285.5　**文献标志码:** A　**文章编号:** 1001-0580(2015)09-1176-04　DOI: 10.11847/zgggws2015-31-09-20

Effect of D-limonene on iron overload in rats with alcoholic liver injury

SUN Ting-ting*, LIANG Hui, LIU Ying, et al (* *The Institute of Human Nutrition, School of Public Health, Qingdao University, Qingdao, Shandong Province* 266021, China)

Abstract: Objective　To establish a rat model of alcoholic liver injury and to explore the effect of D-limonene on iron overload in rats with chronic alcoholic liver injury. **Methods**　Seventy male wistar rats were fed adaptively for seven days and then randomly divided into seven groups (n = 10 for each group), including a control group, a alcohol-model group (alcoholic liver damage), the low, medium and high D-limonene treated groups (100, 200, 400 $mg \cdot kg^{-1} \cdot day^{-1}$), a limonene control group (400 mg/kg), and a glycyrrhizic acid group. The experiment lasted for six weeks. The histopathology of the liver was observed after hematoxylin-eosin (HE) staining. Ultrastructural changes of the livers were observed with transmission electron microscope (TEM). The liver iron content was measured with inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). In addition, the levels of plasma hepcidin, plasma ferritin and plasma hemojuvelin (HJV) were assessed with enzyme-linked immunosobent assay (ELISA). **Results**　In the alcohol-model group, the structure disturbance of hepatic lobule, the diffuse fatty degeneration in the liver tissue, and obvious hyperplasia of the hepatic fibrous tissue with visible spotty necrosis were observed. Compared with those of the alcohol-model group, the degree of structure disturbance in hepatic lobule, liver fatty degeneration and damage were all significantly reduced in various doses D-limonene groups. TEM showed that hepatic ultrastructure lesions, including the structure of endoplasmic reticulum, mitochondria and lipid droplet, were reduced in different doses D-limonene groups compared with alcohol-model group. The rats in alcohol-model group had a significant increase in liver iron content (279.14 ± 5.87 μg/mL) and level of plasma ferritin (57.76 ± 5.83 ng/mL) ($P < 0.05$) compared with those of the normal group; but both the level of hepcidin (61.85 ± 4.85 ng/mL) and HJV (46.21 ± 5.24 ng/mL) were obviously decreased ($P < 0.05$). Compared with those of the model group, both the level of liver iron (180.14 ± 5.76 μg/mL) and plasma ferritin (35.39 ± 3.94 ng/mL) were decreased ($P < 0.05$) and the level of hepcidin (81.36 ± 4.8 ng/mL) and HJV (67.29 ± 5.89 ng/mL) were increased in high dose D-limonene treatments groups ($P < 0.05$). **Conclusion**　D-limonene can restrain iron overload in the rats exposed to ethanol.

Key words: D-limonene; alcoholic liver injury; iron overload; liver iron concentration; hepcidin; serum ferritin; hemojuvelin

* **基金项目:** 国家"十二五"科技支撑计划项目(2012BAD33B01); 国家自然科学基金(31171671)
作者单位: 1. 青岛大学公共卫生学院, 山东 青岛 266021; 2. 青岛大学基础学院; 3. 内蒙古科技大学包头医学院
作者简介: 孙婷婷(1990 –), 女, 山东济宁人, 硕士在读, 研究方向: 营养与食品卫生学。
通讯作者: 梁惠, E-mail: qdlianghui@126.com
数字出版日期: 2015 – 4 – 1 10:04
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20150401.1004.020.html

滥用酒精已经成为世界致残致死五大危险因素之一[1]，酒精能引起一系列的肝脏损伤，进而形成酒精性肝病（alcoholic liver disease，ALD），其病理表现为脂肪肝，肝纤维化，肝硬化[2]。动物实验证实酒精可以导致铁在肝脏中过度蓄积，Kew[3]研究发现铁过载可诱导肝损伤，并且可能会诱发肝细胞癌，Zhang 等[4]研究发现铁与酒精表现出强烈的协同促氧化作用 。柠檬烯为单萜烯类化合物，临床用于治疗胆囊炎。此外，右旋柠檬烯（D-柠檬烯）还有抑制胃食管反流和促进胃肠健康蠕动、镇静中枢神经、缓解心绞痛、抗菌等作用[5]。研究表明柠檬烯对肝脏氧化应激有保护作用，并且能抑制肝癌细胞生长[5]。本研究通过酒精灌胃建立肝损伤动物模型，观察 D－柠檬烯对酒精性肝损伤大鼠肝脏铁浓度（liver iron concentration，LIC）、血浆铁调素（hepcidin，HEPC）、铁蛋白（serum ferritin，SF），血幼素（hemojuvelin，HJV）水平变化，探讨柠檬烯对酒精性肝损伤引起的铁过载拮抗作用，结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　*主要试剂与仪器*　D－柠檬烯（美国 sigma 公司），分子式为 $C_{10}H_{16}$，浓度为 98%，HEPC 检测试剂盒（北京诺亚杰生物科技有限公司），SF、HJV 检测试剂盒（上海迪奥公司）。7500cx 电感耦合等离子体质谱仪（ICP-MS）（美国 Agilent 公司）；微波消解仪（美国 CEM 公司）；密封消解罐（聚四氟乙烯材料）（滨海县正信仪器厂）；分析天平（精密度 0.1 mg）（上海民桥精密科学仪器有限公司）；ELx808 酶标仪（西安明克斯检测设备有限公司）；LEICARM2135 切片机（德国 Leica Biosystems 公司）。

1.2　*动物分组与处理*　2 月龄无特定病原体（specific pathogen-free，SPF）级雄性 Wistar 大鼠 70 只，体重 180～220 g，由青岛派特福德白鼠养殖专业合作社提供，许可证号：SYXK（鲁）2013－0001，适应性喂养 7 d；按体重随机分为 7 组，每组 10 只。对照组，每天用生理盐水灌胃 1 次，连续 6 周，前 2 周每日给予 0.9% 生理盐水 8 mL/kg，后 4 周 12 mL/kg；模型组，前 2 周每日给予 50% 酒精8 mL/kg，后 4 周 12 mL/kg；柠檬烯低、中、高剂量组，分别给予 D－柠檬烯 100、200、400 mg/kg；柠檬烯对照组，每日给予 D－柠檬 400 mg/kg；甘利欣（阳性对照）组，剂量 200 mg/kg。柠檬烯低、中、高剂量组、甘利欣组大鼠给予酒精剂量与方法同模型组，对照组与柠檬烯对照组大鼠给予等量蒸馏水，连续 6 周。末次灌胃后，禁食 12 h，不禁水，称重后给予 7% 水合氯醛 0.5 mL/100 g 腹腔注射麻醉，经腹主动脉取血，剥离肝脏，分离血清，保存于－80 ℃冰箱中备用。

1.3　*指标与方法*

1.3.1　*肝组织形态结构观察*　采用苏木精－伊红（hematoxylin－eosin staining，HE）染色法，将肝脏组织用 10% 中性甲醛固定后，常规石蜡包埋，切片，脱蜡，HE 染色，中性树胶封片，光学显微镜（×400）下观察各组大鼠肝脏形态学改变。

1.3.2　*肝脏超微结构观察*　采用透射电镜法，肝组织 4% 戊二醛灌流固定，包埋，制作切片，电镜（×10 000）下观察肝脏组织超微结构变化。

1.3.3　*肝组织铁含量测定*　采用 ICP－MS 法，取大鼠肝脏 0.4 g，置于消解罐中，加入 0.5 mL 硝酸，再加入 0.5 mL 高氯酸，高氯酸加 2 次，于微波消解仪中消解，冷却，将消化液转移至 10 mL 离心管中，用双蒸水定容至刻度，混匀，上机检测；同时做空白对照。

1.3.4　*血浆 HEPC、SF、HJV 含量测定*　采用试剂盒法，实验步骤严格按照试剂盒说明书进行，在 450 nm处用酶标仪测吸光度（*A*）值，根据标准曲线得出 HEPC、SF、HJV 含量。

1.4　*统计分析*　实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用最小显著差法检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　*D－柠檬烯对酒精性肝损伤大鼠肝脏病理形态学影响*　HE 染色结果显示，对照组大鼠肝组织结构完整，肝细胞以中央静脉为中心向四周呈放射状排列，肝细胞无变性、坏死等形态学改变；模型组大鼠肝小叶结构紊乱，肝组织呈弥漫性大泡性脂肪变性，肝小叶纤维组织增生明显，并可见点灶状坏死，坏死区有炎细胞浸润，汇管区有大量炎细胞浸润；与模型组比较，柠檬烯组大鼠肝细胞坏死程度明显减轻；柠檬烯低剂量组大鼠肝脏大泡性脂变、中央静脉周围脂变明显、汇管区大量炎细胞浸润，柠檬烯中剂量组大鼠肝脏可见大量空泡、脂肪变性形成少量大脂滴、汇管区有少量炎细胞浸润，柠檬烯高剂量组大鼠肝细胞以中央静脉为中心向四周呈放射状整齐排列，大小较一致，无明显脂滴，少量空泡，汇管区少量炎细胞浸润；柠檬烯对照组与甘利欣组大鼠肝细胞以中央静脉为中心向四周呈放射状整齐排列，肝窦无扩张，肝细胞无变性，坏死等形态学改变，汇管区有少量炎细胞浸润。

2.2　*D－柠檬烯对酒精性肝损伤大鼠肝组织超微结构影响*（图 1）　结果显示，对照组大鼠肝细胞形态结构正常，线粒体、高尔基体形态正常；模型组大鼠肝细胞脂滴多，线粒体形状不规则，嵴断裂模糊，

次级溶酶体数量增加,微绒毛数量有所减少,胶原纤维化明显;与模型组比较,柠檬烯低剂量组大鼠肝细胞胞浆脂滴数量减少、核膜比较完整、线粒体形状较规则、次级溶酶体减少,柠檬烯中剂量组大鼠肝细胞胞浆脂滴数量减少、线粒体病变明显减轻且数目增加、粗面内质网退化与排列紊乱程度改善,柠檬烯高剂量组大鼠肝细胞胞浆脂滴数量减少,核膜完整,线粒体形状较规则,次级溶酶体减少。与模型组比较,甘利欣组大鼠肝细胞脂滴较少,偶见溶酶体,线粒体正常。

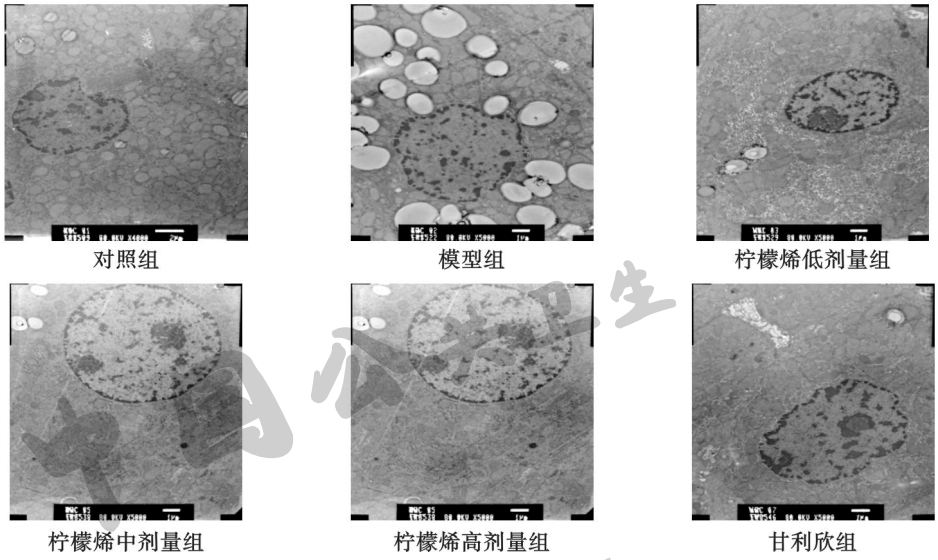

图 1　D – 柠檬烯对大鼠肝细胞超微结构影响(×10 000)

2.3　D – 柠檬烯对酒精性肝损伤大鼠 LIC、血浆 SF、HEPC、HJV 影响(表 1)　试验过程中模型组 3 只大鼠死于操作技术不当。与对照组比较,模型组大鼠肝脏铁含量、血浆 SF 水平明显上升($P < 0.05$),血浆 HEPC、HJV 水平明显下降($P < 0.05$);与模型组比较,各剂量柠檬烯组大鼠肝脏铁含量、血浆 SF 水平下降,HEPC、HJV 水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1　D – 柠檬烯对酒精性肝损伤大鼠 LIC、HEPC、SF、HJV 影响($\bar{x} \pm s$)

组别(mg/kg)		n	LIC(μg/mL)	HEPC(ng/mL)	SF(ng/mL)	HJV(ng/mL)
对照组		10	179.44 ± 4.34	81.84 ± 5.17	36.04 ± 3.51	68.36 ± 4.18
模型组		7	279.14 ± 5.87[a]	61.85 ± 4.85[a]	57.76 ± 5.83[a]	46.21 ± 5.24[a]
柠檬烯	100	10	178.66 ± 6.17[b]	84.05 ± 4.98[b]	34.99 ± 3.37[b]	46.52 ± 6.05[a]
	200	10	178.60 ± 5.13[b]	83.00 ± 6.64[b]	34.66 ± 3.45[b]	56.08 ± 4.14[ab]
	400	10	180.14 ± 5.76[b]	81.36 ± 4.8[b]	35.39 ± 3.94[b]	67.29 ± 5.89[b]
柠檬烯对照组	400	10	179.04 ± 4.09[b]	81.69 ± 6.11[b]	34.82 ± 2.93[b]	63.90 ± 6.24[b]
甘利欣组	200	10	178.47 ± 5.71[b]	82.59 ± 5.89[b]	36.46 ± 3.63[b]	66.52 ± 6.85[b]

注:与对照组比较,a $P < 0.05$;与模型组比较,b $P < 0.05$。

3　讨　论

研究表明,萜类化合物具有广泛地生理学与药理学活性,如抗氧化、抗肿瘤、抑菌、调节血脂,抗炎等作用[6]。戈娜[7]研究表明,海兔素可以显著下调酒精性肝损伤大鼠体内诱导型一氧化氮合酶表达,减少一氧化氮过量生成,减轻酒精引起的肝组织损伤。Li 等[8]研究报道,人参皂苷能激活 Nrf2 通路,从而显著减轻酒精引起的肝组织纤维化。D – 柠檬烯是一种天然的功能性萜类化合物,具有抗肝癌作用。铁是人体必需元素之一,维持人体正常生理功能离不开铁元素,但是如果铁过量,则会对身体造成一定的伤害。除铁代谢相关基因变异和外源性铁摄入过多之外,某些病理情况也可导致铁过载。长期大量饮酒使血浆和肝组织(小叶中央区)中含铁血黄素明显升高,导致铁在肝脏中沉积,加重肝脏功能损害。而铁又可通过 Haber-Weiss 反应,最终造成肝细胞死亡,而肝细胞的死亡又会进一步加重肝脏铁过载,形成恶性循环。而打破这一恶性循环的关键在于消除铁过载[9]。在成人体内大约有 4 ~ 5 g 铁,70% 以血红蛋白和肌红蛋白的形式存在于骨骼和血液中,当体内铁超负荷时,70% 铁则沉积在肝中。铁蛋白为机体内一种贮存铁的可溶组织蛋白,血浆铁蛋白浓度与体内储存的铁成正比。铁调素是

维持铁稳态极其重要的负调节激素[10]，通过调节铁的吸收和利用而维持机体铁平衡。铁调素表达水平受体内铁含量，红血球生成活跃程度，体内低氧状况的影响。Goodnough 等[11]研究发现，过量饮酒可以使铁调素转录下调，肠道铁转运蛋白表达增加，促进肠道铁吸收，最终导致肝脏铁异常堆积。铁调素的高表达能够抑制铁的超负荷从而改善肝损伤[12]。血幼素是一种糖化磷脂酰肌醇锚连的膜蛋白，是一种重要的铁调素调节蛋白，控制铁调素的编码基因表达在正常范围内[13]。

本研究结果表明，酒精模型组大鼠肝脏总铁含量、血浆铁蛋白水平明显高于对照组，而铁调素、血幼素表达明显低于对照组；酒精模型组大鼠肝脏细胞内线粒体数量减少，脂滴增多，粗面内质网排列紊乱，并且有大量炎细胞浸润等肝脏损伤的病理表现；柠檬烯各剂量组大鼠肝脏总铁含量、血浆铁蛋白水平明显低于模型组，铁调素与血幼素明显高于模型组，且肝脏病变减轻，脂滴减少，粗面内质网排列紊乱与退化程度有所改善。提示 D－柠檬烯对酒精性肝损伤大鼠的铁过载有一定拮抗作用，其机制可能与上调肝脏铁调素水平有关。

参考文献

[1] Torruellas C, French SW, Medici V, et al. Diagnosis of alcoholic liver disease[J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(33): 11684－11699.

[2] 张桂英，吴光健，王宝贵，等. 白桦脂醇对大鼠酒精性肝损伤保护作用[J]. 中国公共卫生，2009，25(3)：378－379.

[3] Kew MC. Hepatic iron overload and hepatocellular carcinoma[J]. Livr Cancer, 2014, 3(1): 31－40.

[4] Zhang ZY, Liu D. Taurine supplementation reduces oxidative stress and protects the liver in an iron-overload murine model[J]. Molecular Medicine Reports, 2014, 10: 2255－2262.

[5] 李思思，王涛. 右旋柠檬烯的研究进展及其新型专利技术[J]. 河南医学研究，2013，22(4)：636－638.

[6] Cheung FW, Li C, Che CT, et al. Geoditin A induces oxidative stress and apoptosis on human colon HT29 cells[J]. Marine Drugs, 2010, 8(1): 80－90.

[7] 戈娜. 海兔素对慢性酒精性肝损伤大鼠肝超微结构及 NO 和 iNOS 的影响[J]. 中国海洋药物，2014，33(3)：63－68.

[8] Li JP, Gao Y, Chu SF, et al. Nrf2 pathway activation contributes to anti-fibrosis effects of ginsenoside Rg1 in a rat model of alcohol and CCl4-induced hepatic fibrosis[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2014, 35: 1031－1044.

[9] 马明霞，任源. 表没食子儿茶素没食子酸酯对酒精性肝病小鼠肝脏 Tf 和 TfRl 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19(1)：268－271.

[10] Chaiung B, Chston T, Marks J, et a1. Hepcidin decreases iron transporter expression *in vivo* in mouse duodenum and spleen and *in vitro* in THP-1 macro-phages and intestinal Caco-2 cells[J]. The Journal of Nutrition, 2009, 139(8): 1457－1462.

[11] Goodnough JB, Ramos E, Nemeth E, et a1. Inhibition of hepcidin transcription by growth factors[J]. Hepatology, 2012, 56(1): 291－294.

[12] 韦远欢，施文祥，任源，等. EGCG 对酒精性肝病小鼠肝脏铁调素表达影响[J]. 中国公共卫生，2014，30(3)：305－307.

[13] Przybyszewska J, Zekanowska E. The role of hepcidin and haemojuvelin in the pathogenesis of iron disorders in patients with severe malnutrition[J]. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 2014, 21(2): 336－338.

收稿日期：2014－12－11　（解学魁编辑　张翠校对）

· 调查报告与分析 ·

新发房颤患者缺血性卒中风险不同方法评估

周志宏，陈漠水，马添翼

摘　要：目的　比较 $CHADS_2$ 和 CHA_2DS_2-VASc 2 种评分方法对心房颤动（房颤）人群的缺血性脑卒中风险评估的差异。**方法**　采用前瞻性队列研究方法，对 143 例新发非瓣膜性房颤患者，用 $CHADS_2$ 和 CHA_2DS_2-VASc 2 种评分方法进行卒中风险评估，比较 2 种评估方法得分以及卒中危险分层的差异。**结果**　$CHADS_2$ 平均得分为（1.51±1.28）分，CHA_2DS_2-VASc 平均得分为（2.36±1.97）分，后者明显高于前者（$P<0.01$）；CHA_2DS_2-VASc 评分低危组 19 例（13.3%），低于 $CHADS_2$ 评分低危组的 46 例（32.2%）（$\chi^2=11.21$，$P<0.01$）；CHA_2DS_2-VASc 评分中危组的 32 例（22.4%），低于 $CHADS_2$ 评分中危组 42 例（29.4%）（$\chi^2=4.57$，$P<0.01$）；CHA_2DS_2-VASc 评分高危组的 92 例（64.3%），高于 $CHADS_2$ 评分高危组 55 例（38.5%）（$\chi^2=20.76$，$P<0.01$）；$CHADS_2$ 评分法中，低度、中度、高度风险组，脑卒中发生例数分别为 1、2、3 例；CHA_2DS_2-VASc 评分法中，低度、中度、高度风险组脑卒中发生例数分别为 0、0、6 例。**结论**　与 $CHADS_2$ 评分法比较，CHA_2DS_2-VASc 评估卒中风险中、低危组比例降低，高危组比例升高。

关键词：心房颤动；脑卒中；风险评估；CHA_2DS_2-VASc 评分；$CHADS_2$ 评分

中图分类号：R 541.7+5　**文献标志码**：A　**文章编号**：1001-0580(2015)09-1179-03　DOI：10.11847/zgggws2015-31-09-21

Risk of ischemic stroke among newly diagnosed non-valvular atrial fibril-

作者单位：海口市人民医院暨中南大学湘雅医学院附属海口医院心血管内科，海南 570208

作者简介：周志宏（1973－）女，内蒙古赤峰人，副主任医师，硕士，研究方向：心血管疾病诊治。

数字出版日期：2015－8－10 10：14

数字出版网址：http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20150810.1014.008.html