

# 小金海棠多酚对肝纤维化的改善及机制研究

韦月平, 王鹏

(辽东学院 农学院, 辽宁 丹东 118003)

**摘要:** 研究小金海棠多酚对 CCl<sub>4</sub> 诱导小鼠肝纤维化的改善作用及机制。采用皮下注射 CCl<sub>4</sub> 诱导小鼠肝纤维化,同时小金海棠多酚(MXP)灌胃给药(10 mg/kg、20 mg/kg)的方法。结果表明,皮下注射 CCl<sub>4</sub> 诱导小鼠肝脏发生明显的损伤。与模型组相比,喂食小金海棠多酚显著降低了血清和肝组织中 ALT 与 AST 活性,同时肝组织中 SOD 和 GSH-PX 活性显著提高。形态和组织学检测表明,小金海棠多酚显著逆转 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝损伤。此外,喂食小金海棠多酚能显著抑制皮下注射 CCl<sub>4</sub> 引发的 IL-1、IL-6 和 TNF- $\alpha$  等炎症细胞因子的生成。以上结果表明,小金海棠多酚可以明显减轻 CCl<sub>4</sub> 诱导产生的肝纤维化,其作用机制可能与其增强机体抗氧化能力、抑制炎症细胞因子合成有关。

**关键词:** 小金海棠;多酚;保肝;肝纤维化

中图分类号:TS 201.4 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2018)07—0764—05

## Study on Induced Live Injury and Fibrosis By *Malus xiaojinensis* Polyphenols

WEI Yueping, WANG Peng

(Agriculture college, Eastern Liaoning University, Dandong 118003, China)

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the anti-hepatic fibrosis mechanism of *Malus xiaojinensis* polyphenols (MXP). Mice with Subcutaneous injection of CCl<sub>4</sub> were set as the animal model of live injury and fibrosis while those treated with MXP by gavage (10 mg/kg, 20 mg/kg) was used as the prevention groups. The results showed that CCl<sub>4</sub> caused severe liver injury with increased activity of ALT and AST. Meanwhile the model mice had reduced activity of SOD and GSH-PX. Compared with the model group, MXP decreased the activity of ALT and AST in serum and liver and increased the activity of SOD and GSH-PX significantly. Both morphologic and histological detections indicated that MXP could ameliorate the degree hepatocyte injury and privation of the liver fibrosis. Moreover, feeding of MXP could inhibit the production of IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$ . The study showed that MXP could partly reverse CCl<sub>4</sub> induced hepatic fibrosis by enhancing anti-oxidative function and down-regulating inflammatory cytokine synthesis. MXP may be developed as a novel antioxidant for prevention of the liver diseases.

**Keywords:** *Malus xiaojinensis*, polyphenols, liver protection, hepatic Fibrosis

收稿日期: 2016-03-21

基金项目: 辽东学院青年基金项目(QN030)。

作者简介: 韦月平(1972—),女(侗族),广西来宾人,农学硕士,副教授,主要从事食品营养保健研究。E-mail:95759605@qq.com

引用本文: 韦月平,王鹏. 小金海棠多酚对肝纤维化的改善及机制研究[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(07):764-768.

肝脏是机体生物转化和物质代谢最重要的器官,肝脏损伤是由体内各种刺激因子侵袭所诱发的炎症反应导致的<sup>[1]</sup>。各种慢性肝损伤都会引发肝细胞坏死、炎症并继发纤维化的病理特征,从而导致肝纤维化<sup>[2]</sup>。研究表明,氧化应激是引起肝损伤发生的主要机制之一,在氧化应激状态下,抗氧化系统失衡,自由基过量生成,炎症过度积累,最终造成肝脏损伤<sup>[3]</sup>。

小金海棠(*Malus xiaojinensis*)是中国自主筛选出的第一个抗缺铁黄叶病苹果基因型,已在国内广泛种植开发<sup>[4]</sup>,其果实内含有丰富的营养成分,特别是多酚类物质质量分数可达0.9%,主要包括芦丁、根皮苷、绿原酸、槲皮素、表儿茶素、儿茶素、原儿茶酸、金丝桃苷以及少量对香豆酸和阿魏酸等<sup>[5]</sup>。研究显示植物多酚类物质具有超强的抗氧化活性和降血糖、降血脂、保护心脑血管、抗癌、抗菌等多种活性作用<sup>[6-7]</sup>。但是对于小金海棠多酚(MXP)的活性研究较少。作者拟采用皮下注射 CCl<sub>4</sub> 建立小鼠肝纤维化模型,探讨小金海棠多酚对 CCl<sub>4</sub> 诱导小鼠肝纤维化的改善作用及机制,以为小金海棠功能食品的开发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

实验动物:SPF级6~8周龄雄性昆明小鼠(KM):购于辽宁长生生物技术有限公司(SCXK 2015-0001)。

实验材料:小金海棠多酚(*Malus xiaojinensis* Polyphenols, MXP),作者自提取于新鲜小金海棠果,纯度>90%。

实验试剂:CCl<sub>4</sub>(分析纯,纯度>99.5%):购于鼎国生物技术有限公司;谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)检测试剂盒:购自南京建成生物工程研究所;苏木素伊红染色试剂盒(HE试剂盒):购自武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.2 仪器与设备

Infinite F200/M200型酶标仪:TECAN公司产品;5430R型台式冷冻离心机:德国Eppendorf公司产品;ND-2000超微量核酸蛋白测定仪:赛默飞世尔科技公司产品;ABI 7500定量PCR仪:美国应用生物系统公司产品;组织切片机:德国Leica公司产品。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 动物分组及处理** 小鼠经1周适应饲养后,随机分成实验组与对照组。实验组用体积分数20%的CCl<sub>4</sub>橄榄油皮下注射,同时实验组分为3组每天进行相应的灌胃处理,即模型组(生理盐水)、低剂量组(10 mg/kg)和高剂量组(20 mg/kg)。每周称量小鼠体质量,观察其活动及精神状态,处理6周后,眼球采血,处死后摘取肝脏。

**1.3.2 血清ALT和AST活性测定** 眼球取出的血液4℃静置1h后以3500 r/min于4℃离心10 min,取上清即为血清。按照试剂盒操作方法测定血清ALT和AST活性。

**1.3.3 肝脏指数的测定** 取肝组织1g,加入9 mL的生理盐水,制成匀浆并测定其浓度。按照试剂盒操作方法测定ALT、AST及SOD、GSH-PX活性。

**1.3.4 HE染色** 取小鼠肝脏用体积分数4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋切片,切片常规用二甲苯脱蜡,经各级乙醇至水洗,苏木素染色5 min,自来水冲洗,盐酸乙醇分化30 s,自来水浸泡15 min,置伊红液2 min,常规脱水、透明、封片。用显微镜观察并拍照。

**1.3.5 肝组织炎症细胞因子IL-1、IL-6和TNF-α测定** 每实验组取3只小鼠的肝组织各20 mg,提取总RNA。RT-PCT检测炎症细胞因子转录水平。炎症细胞因子引物设计如下:肿瘤坏死因子(TNF-α),上游5'-CCCTCAGACTCAGATCATCTTCT-3',下游5'-GCTACGACGTGGGCTACAG-3';白细胞介素(IL)-1,上游5'-GCAACTGTTCCCTGAACTCAACT-3',下游5'-ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT-3';IL-6,上游5'-TAGTCCTTCCTACCCCAATTTC-3',下游5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'。β-actin作为内参。

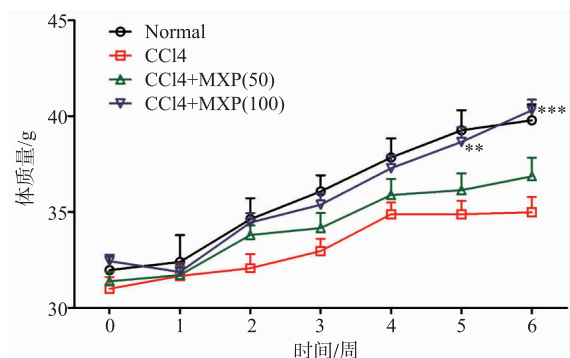
**1.3.6 数据统计处理** 结果采用平均值±标准差格式。不同组间结果比较用单因素方差分析,统计结果 $p<0.05$ 认为差异显著,所有结果统计用SPSS软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 小金海棠多酚(MXP)抵御小鼠肝纤维化过程中体质量的变化

肝纤维化会导致体内代谢障碍,通常会出现体质量的减轻的症状。如图1所示,2周过后CCl<sub>4</sub>建模小鼠体质量明显低于正常组。小金海棠多酚

(MXP) 对小鼠肝纤维化伴随的体质量降低有着明显的抵抗作用,20 mg/kg MXP 组在第 5 周与第 6 周的效果非常显著 ( $P<0.01$ 、 $P<0.001$ )。

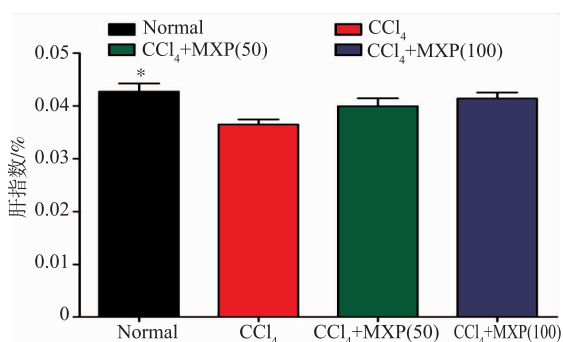


注:与模型组相比, \* $p<0.05$

图 1 小金海棠多酚对小鼠肝纤维化过程中体质量变化的影响  
Fig. 1 Effect of MXP on the body weight of mice in Hepatic Fibrosis

### 2.2 小金海棠多酚(MXP)对肝纤维化小鼠肝指数的影响

如图 2 所示,纤维化小鼠的肝指数也显著低于正常组 ( $p<0.05$ )。MXP 对肝指数的降低有一定的抵抗效果,而且随着其剂量的增加,效果会愈加明显,其中 20 mg/kg 组的肝指数为 0.041,已经非常接近正常组的 0.043。其结果显示,MXP 对于肝损伤导致的肝萎缩有一定的缓解作用。



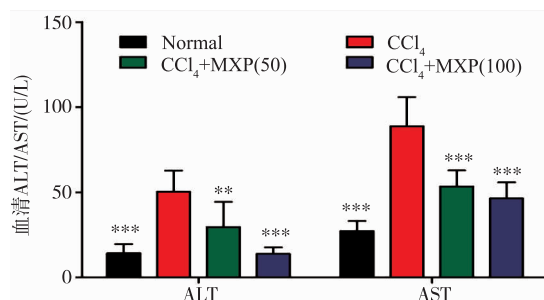
注:与模型组相比, \* $p<0.05$

图 2 小金海棠多酚对肝纤维化小鼠肝指数的影响  
Fig. 2 Effect of MXP on the liver index of mice in Hepatic Fibrosis

### 2.3 小金海棠多酚(MXP)对肝纤维化小鼠血清中 ALT 与 AST 活性的影响

谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)升高是肝脏发生损伤的重要生化指标<sup>[8-9]</sup>。如图 3 所示,与

正常组相比,模型组小鼠血清中 ALT 与 AST 活性均显著升高 ( $p<0.001$ )。与模型组相比,灌胃 MXP 可显著抑制血清中 ALT 与 AST 活性升高 ( $p<0.001$ ),且 20 mg/kg 剂量组的效果优于 10 mg/kg 剂量组。



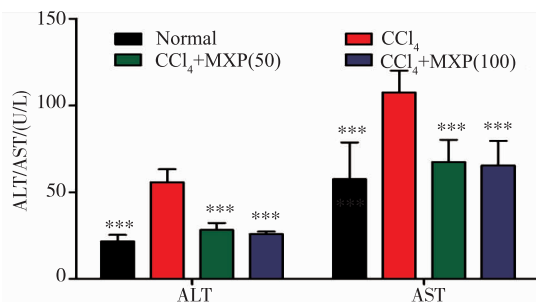
注:与模型组相比, \* $p<0.05$

图 3 小金海棠多酚对肝纤维化小鼠血清中 ALT 与 AST 活性的影响

Fig. 3 Effect of MXP on serum lipid (ALT,AST) of mice in Hepatic Fibrosis

### 2.4 小金海棠多酚(MXP)对肝纤维化小鼠肝脏中 ALT 与 AST 水平的影响

MXP 对肝脏中 ALT 与 AST 的活性的影响和血清中的情况相似,如图 4 所示,正常组的 ALT、AST 明显小于模型组 ( $P<0.005$ ),分别达到 111.4 U/g 和 215.0 U/g。MXP 可以显著降低二者的活性 ( $P<0.001$ ),并且 20 mg/kg 的效果更加明显,其中 ALT 降至 51.3 U/g,AST 降至 130.9 U/g。



注:与模型组相比, \* $p<0.05$

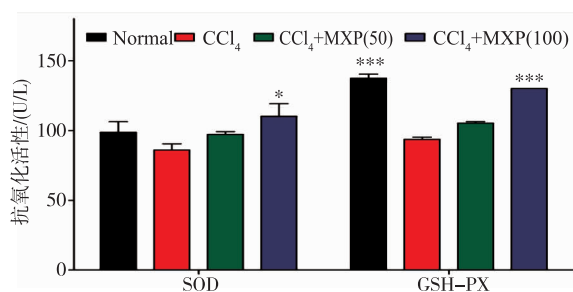
图 4 小金海棠多酚(MXP)对肝纤维化小鼠肝脏中 ALT 与 AST 水平的影响

Fig. 4 Effect of MXP on ALT andAST in liver of mice in Hepatic Fibrosis

### 2.5 小金海棠多酚(MXP)对肝纤维化小鼠肝脏中 SOD、GSH-PX 活性的影响

抗氧化酶(包括 SOD 与 GSH-PX)作为生物体

重要的一类蛋白因子,抗氧化活性降低会引起许多慢性疾病及衰老的发生,其中就包括肝损伤<sup>[10]</sup>。如图5所示,肝纤维化小鼠肝脏中的抗氧化酶活性明显小于正常小鼠,特别是GSH-PX( $P<0.001$ )。而MXP能显著抑制这种状况,而且随着剂量的升高效果愈加显著,20 mg/kg时SOD的显著性为0.05,GSH-PX的显著性为0.001。



注:与模型组相比,\* $p<0.05$

图5 小金海棠多酚(MXP)对肝纤维化小鼠肝脏中SOD、GSH-PX活性的影响

Fig. 5 Effect of MXP on SOD and GSH-PX in liver of mice in Hepatic Fibrosis

### 2.6 小金海棠多酚(MXP)对肝纤维化小鼠肝脏病理形态的影响

正常对照组小鼠肝脏颜色红润,显微镜观察到肝细胞排列规则,胞质丰富,核大而圆,核仁清晰。肝纤维化模型的肝脏发生明显病理改变,其表面无光泽,光镜下观察到其细胞出现严重的炎症反应,肝细胞出现中至重度病变,胞浆疏松、细胞核多皱缩。MXP能够缓解肝损伤,特别是20 mg/kg组,其结构完整,肝索呈放射状排列,部分肝细胞仅见轻度的病理改变。

### 2.7 小金海棠多酚(MXP)对肝纤维化小鼠肝脏中炎症因子表达的影响

肝纤维化的发生是多因素过程,与多个相关细胞因子有关。IL-1、IL-6及TNF $\alpha$ 是机体内常见的炎症细胞因子。如图7所示,肝纤维化小鼠体内的炎症细胞因子水平明显高于正常小鼠,转录水平IL-1为6.29、IL-6为8.10、TNF $\alpha$ 为2.00,其中IL-6和TNF $\alpha$ 最为显著( $P<0.01$ ),而MXP能显著降低炎症的发生,20 mg/kg组的效果比较显著,3类炎症因子转录水平可降低至1.83、4.07、0.85。实验结果显示,MXP可能通过抑制炎症的发生对肝纤维化进行抵御。

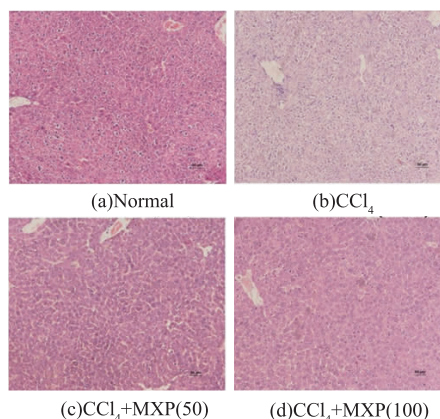
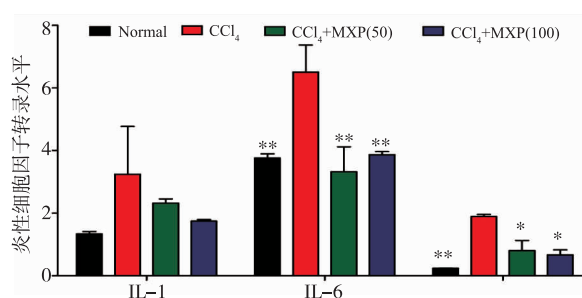


图6 小金海棠多酚(MXP)对肝纤维化小鼠肝脏病理形态的影响

Fig. 6 Effect of MXP on Morphologic of Pathology in liver of mice in Hepatic Fibrosis



注:与模型组相比,\* $p<0.05$

图7 小金海棠多酚(MXP)对肝纤维化小鼠肝脏中相关炎症因子表达的影响

Fig. 7 Effect of MXP on the expression of inflammatory cytokines in liver of mice

## 3 结语

实验结果表明,小金海棠多酚能显著抵御皮下注射CCl<sub>4</sub>引发的肝纤维化,这种效果可能与其强抗氧化性有关<sup>[11]</sup>,并且它还能抑制炎症的发生包括IL-1、IL-6及TNF $\alpha$ 。

肝脏是机体的主要代谢器官,容易被中间活性物质氧化损伤。肝损伤主要是由于生物膜功能受到损害,体内酶的活性失衡,在细胞因子(如IL-1、IL-6、TNF $\alpha$ )的共同作用下引起的<sup>[12]</sup>。SOD与GSH-PX作为机体内重要的抗氧化酶可以保护肝脏免受中间活性物质引起的氧化损伤<sup>[13]</sup>。作者选取这2个关键抗氧化酶作为检测目标,发现小鼠在CCl<sub>4</sub>注射6周后,两者活性明显下降,而小金海棠多酚组的活性显著高于CCl<sub>4</sub>模型组,这说明小金海棠多酚能改

善氧应激引起的氧化系统的失衡,对肝纤维化形成过程中的过氧化有一定的抑制作用,从而起到保肝护肝的作用。

肝损伤,特别是肝纤维化的形成是多种致病因子引起的肝脏炎症或损伤后组织修复过程中的代偿反应,所以控制细胞炎症的发生是预防治疗肝纤维化的重要手段。研究显示,CCl<sub>4</sub>诱导的急性肝损伤小鼠肝细胞内的炎症水平(IL-1,IL-6及

TNF- $\alpha$ )明显高于正常小鼠,同时小金海棠多酚处理之后的小鼠肝内的炎症也明显受到了抑制,特别是IL-6和TNF- $\alpha$ ,这说明小金海棠多酚可能是通过抑制肝内炎症的发生来抵御肝损伤。

小金海棠多酚可能对肝纤维化有一定的抵御作用,其作用机制可能是通过抗氧化作用和降低机体炎症的发生而对肝纤维化进行抑制。

## 参考文献:

- [ 1 ] LING L, MIN F, JIA G, et al. Restoration of intrahepatic regulatory T cells through MMP-9/13-dependent activation of TGF- $\beta$  is critical for immune homeostasis following acute liver injury[J]. **Journal of Molecular Cell Biology**, 2013, 5(6):369-379.
- [ 2 ] SAIDAN D, BICHENG C. Pathogenesis of hepatic fibrosis analyzed at the proteome level [J]. **Saudi Medical Journal**, 2012, 33(2):123-127.
- [ 3 ] KENTARO M, EITA S, SATONORI H, et al. Involvement of oxidative stress and immune- and inflammation-related factors in azathioprine-induced liver injury[J]. **Toxicology Letters**, 2014, 224(2):215-224.
- [ 4 ] 李楠. 海棠多酚的种类及其体外抗氧化活性和抑菌活性研究[D]. 咸阳:西北农林科技大学, 2014.
- [ 5 ] 王立峰. 薏米中多酚类物质对抗氧化、抗肿瘤和降血脂作用的评价研究[D]. 无锡:江南大学, 2012.
- [ 6 ] 左丽丽. 狗枣猕猴桃多酚的抗氧化与抗肿瘤效应研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学, 2013.
- [ 7 ] YANG Rundong, LI Weihuan, LV Fangfang. Optimization of the extraction technique and the antioxidant activity of polysaccharides from pleurotus geesteranus[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31(10):78-80. (in Chinese)
- [ 8 ] 刘鸣昊. 芪珠方对肝纤维化大鼠 TGF- $\beta$  1/Smad 信号传导通路的影响[D]. 南京:南京中医药大学, 2013.
- [ 9 ] YANG Yin, SUN Weiwu, ZHOU Cheng, et al. Optimization of water-soluble polysaccharides extraction from rhizome of polygonatum odoratum using response surface methodology and its antioxidant activities in vitro[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(3):200-203. (in Chinese)
- [10] XU Zhaoxia, DING Mingqiao, CHEN Rui. The influence of Huaxian decoction on the level of GSH-PX SOD and MDA from the lung tissues in rats with blyomicin - induced pulmonary fibrosis [J]. **Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine**, 2007(8):1671-1673. (in Chinese)
- [11] JUNG J C, LEE Y H, KIM S H, et al. Hepatoprotective effect of licorice, the root of Glycyrrhiza uralensis Fischer, in alcohol-induced fatty liver disease[J]. **BMC Complement Altern Med**, 2015, 16(1):19-22.
- [12] MONTANA J G, DYKE H J, MAXEY R J, et al. 3,4-disubstituted-phenylsulphonamides and their therapeutic use: WO, US5728712[P]. 1998.
- [13] LI J L, LIM C H, TAY F W, et al. Self-regulate immune complex-mediated cutaneous inflammation through CXCL2 [J]. **Journal of Investigative Dermatology**, 2016, 136(2):416-424.