

实验研究

苹果多酚对卡介苗联合脂多糖所致小鼠
免疫性肝损伤的保护作用王芳^{1,2} 薛杨^{1,2} 杨静玉^{1,2} 王欢^{1,2} 吴春福^{1,2}

(1 沈阳药科大学神经药理学系, 沈阳, 110016; 2 辽宁省植物多酚研究与开发工程技术研究中心, 沈阳, 110016)

摘要 目的:观察苹果多酚(Apple Polyphenols, AP)对小鼠免疫性肝损伤的保护作用。方法:采用卡介苗联合脂多糖制备小鼠免疫性肝损伤模型。研究 AP 对小鼠肝指数和脾指数,血清中谷草转氨酶(Aspartate Transaminase, AST)和谷丙转氨酶(Alanine Transaminase, ALT)活性,血清总蛋白(Total Protein, TP),白蛋白(Albumin, Alb)和白蛋白/球蛋白(A/G)含量的改善作用,同时采用 HE 染色方法观察 AP 对免疫性肝损伤小鼠肝脏病理改变的保护作用。结果:AP 能明显抑制免疫性肝损伤模型小鼠异常升高的肝指数和脾指数,降低血清中 AST 活性,不同程度地升高血清中 TP 和 Alb 的含量,同时对肝组织病理异常变化也有显著的改善作用。结论:AP 对卡介苗联合脂多糖所致的小鼠免疫性肝损伤具有保护作用。

关键词 苹果多酚;卡介苗;脂多糖;免疫性肝损伤

Hepatoprotective Role of Apple Polyphenols against Immunological Liver Injury in Mice

Wang Fang^{1,2}, Xue Yang^{1,2}, Yang Jingyu^{1,2}, Wang Huan^{1,2}, Wu Chunfu^{1,2}

(1 Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2 Liaoning Plant Polyphenols Research and Development Technology Research Center, Shenyang 110016, China)

Abstract Objective: To observe hepatoprotective role of apple polyphenols (AP, Appjfnol®) on immunological liver injury in mice. **Methods:** An immunological liver injury model in mice was established by intravenous injection of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) and lipopolysaccharide (LPS). The liver index and spleen index, the activities of serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), the levels of serum total protein (TP), albumin (Alb) and albumin/globulin (A/G) were detected. Histopathologic change was also investigated by HE staining. **Results:** AP inhibited the increases of liver index and spleen index, prevented the increase of serum AST activity and the decrease of serum TP and Alb levels. Histopathological abnormalities were also improved after AP administration. **Conclusion:** AP played a significant hepatoprotective role against BCG and LPS induced immunological liver injury in mice.

Key Words Apple polyphenols; Bacillus Calmette-Guerin; Lipopolysaccharide; Immunological liver injury

中图分类号:R-332;R593.9 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.09.029

肝脏是机体排解毒物和代谢的重要器官,易受多种病原体、毒物及免疫紊乱所累及,引发肝脏疾病,影响人体正常的生理功能。病毒性肝炎、自身免疫性肝病等是困扰人类已久的肝脏疾病,多数易由急转慢,长期可发展至肝纤维化、肝硬化,甚至肝癌等,因此在这类疾病的早期防治方面,阻止慢性发展过程、保护肝功能就显得十分关键和重要。虽然这类疾病诱发因素各有不同,但是目前公认异常免疫应答是这类肝病发病的重要机制之一^[1-2]。因此,利用免疫反应诱导的肝损伤动物实验模型,从天然产物中寻求能显著减轻肝损伤,提高肝功能且安全性高的活性成分就具有重要

的现实意义。

苹果多酚(Apple polyphenols, AP)是苹果中具有重要生物活性的一类天然多酚类物质,具有强抗氧化、清除自由基作用^[3-4],在抗癌^[5-6]、抗过敏^[7-8]、抑菌^[9]、抗炎^[10]和减肥降脂^[11]等方面都表现出良好的活性。因 AP 具有众多活性功能和潜在的开发应用前景,其研究越来越受到人们的关注。我们前期研究已经发现 AP 能通过清除自由基、提高机体抗氧化能力对 CCl₄ 等所致化学性肝损伤具有显著的改善作用^[12]。我们利用卡介苗(Bacillus Calmette-Guerin vaccine, BCG)联合脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)方

基金项目:沈阳市科学技术项目计划资助(编号:F13-318-1-20)

通信作者:吴春福(1952.2—),男,博士,教授,沈阳药科大学党委书记,研究方向:天然产物活性研究, E-mail: wucf@syphu.edu.cn, chunfuw@gmail.com

法诱导建立小鼠免疫性肝损伤模型,来研究 AP 对免疫性肝损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 药品 AP 由天津尖峰天然产物研究开发有限公司提供。含有多酚类物质 81.29%,其中绿原酸 17.08%,原花青素 7.31%,根皮苷 5.17%。实验时用蒸馏水配制成所需浓度。联苯双酯滴丸(Bifondate Pills,BP),浙江医药股份有限公司新昌制药厂,批号 090701。BCG,中国生物制品检定检验所,批号:2008-7。LPS,Sigma 公司,批号 103H0524。

1.2 动物 昆明种小鼠(雄性)SPF 级,体质量(20±2)g,沈阳药科大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK2007-004。适应性饲养 2~3 d 后进行实验。

1.3 仪器 美国 BH13MD1600 型全自动生化分析仪。瑞士 L104-IC 型电子天平。

1.4 动物分组、模型建立及给药 小鼠随机分为 6 组:溶媒对照组,模型组,阳性药联苯双酯滴丸(BP)组,AP 200、400 和 800 mg/kg 剂量组。采用 BCG 联合 LPS 制备免疫性肝损伤模型。实验第 1 d,除溶媒对照组尾静脉注射等容量生理盐水外,各组小鼠经尾静脉注射 BCG 2.5 mg/0.2 mL/只。溶媒对照组和模型组灌胃蒸馏水,阳性药组灌胃 BP 200 mg/kg,AP 组灌胃 AP 200、400 或 800 mg/kg,连续给药 12 d。末次给药后除溶媒对照组尾静脉注射等容量生理盐水外,其他各组小鼠尾静脉注射脂多糖 LPS 7.5 μg/0.2 mL/只。

1.5 血清 AST、ALT、TP 和 Alb 检测 LPS 注射 10 h 后眶静脉丛取血,3 500 r/min 离心 10 min,分离血清。全自动生化分析仪测定 AST、ALT、TP 和 Alb 水平,并计算 A/G 值。计算方法如下。

$$A/G \text{ 值} = \frac{\text{白蛋白}}{\text{球蛋白}} \quad (\text{球蛋白} = \text{总蛋白} - \text{白蛋白})$$

1.6 肝指数和脾指数计算 实验末日动物称重,将动物处死,取肝和脾称重,计算肝指数和脾指数。计算方法如下。

$$\text{肝指数} = \frac{\text{肝重}}{\text{体重}} \times 100\% \quad \text{脾指数} = \frac{\text{脾重}}{\text{体重}} \times 100\%$$

1.7 肝脏病理学检查 取肝右小叶置于 10% 甲醛中,固定,HE 染色,进行组织病理学检查,病理变化分级评价判断标准如下^[13]:根据肝组织炎症、坏死程度,将肝组织病理改变分五级(0-IV);“0”肝细胞形态结构正常,无损害,无坏死;“I”有轻微变性水肿,散在炎细胞,点状坏死;“II”肝细胞坏死呈灶状或片状,占肝小叶 1/3 以内,炎症细胞浸润呈灶状;“III”肝细胞坏

死呈广泛坏死,占小叶 1/3 ~ 1/2,炎症浸润呈片状;“IV”肝细胞坏死占小叶 1/2 以上,重度炎性细胞浸润,呈片状。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,实验数据用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 One-Way ANOVA 单因素方差分析评价整体性差异,方差齐性用 LSD 方法进行组间比较,方差不齐用 Dunnett's T3 分析方法进行组间比较。病理学评分采用秩和检验进行比较。

2 结果

2.1 AP 对免疫性肝损伤小鼠肝指数和脾指数的影响

与对照组相比,BCG 联合 LPS 所致的免疫性肝损伤小鼠出现肝指数和脾指数显著升高($P < 0.01$)。给药 12 d 后,AP 200、400 和 800 mg/kg 均可显著抑制 BCG 和 LPS 引起的肝、脾指数的升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。阳性药 BP 200 mg/kg 同样能显著抑制 BCG 和 LPS 引起的肝、脾指数的升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果见表 1。

表 1 AP 对免疫性肝损伤小鼠肝指数和脾指数的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	剂量	例数	肝指数(%)	脾指数(%)
溶媒对照	—	12	4.82 ± 0.10	0.59 ± 0.03
BCG + LPS	2.5 mg + 7.5 μg/只	8	5.61 ± 0.18**	0.73 ± 0.05**
AP	200 mg/kg	10	5.11 ± 0.14 [△]	0.62 ± 0.01 [△]
	400 mg/kg	8	5.17 ± 0.15 [△]	0.63 ± 0.02 [△]
	800 mg/kg	9	5.11 ± 0.14 [△]	0.61 ± 0.03 ^{△△}
BP	200 mg/kg	8	4.89 ± 0.08 ^{△△}	0.58 ± 0.03 [△]

注:与溶媒对照组比,** $P < 0.01$;与模型组比,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$ 。

2.2 AP 对免疫性肝损伤小鼠血清 AST 和 ALT 的影响 BCG 联合 LPS 所致的免疫性肝损伤小鼠血清中 AST 和 ALT 活性显著升高($P < 0.01$),AP 800 mg/kg 给药 12 d 后显著降低 BCG 联合 LPS 所致的免疫性肝损伤小鼠血清中升高的 AST 活性($P < 0.05$)。阳性药 BP 200 mg/kg 也能使血清中异常升高的 AST 和 ALT 活性显著降低($P < 0.01$, $P < 0.01$)。结果见表 2。

表 2 AP 对免疫性肝损伤小鼠血清 ALT 和 AST 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	剂量	例数	AST(U/L)	ALT(U/L)
溶媒对照组	—	12	114.77 ± 2.93	39.54 ± 3.53
BCG + LPS	2.5 mg + 7.5 μg/只	12	822.83 ± 44.87**	375.00 ± 21.76**
AP	200 mg/kg	10	639.50 ± 40.53	308.89 ± 86.96
	400 mg/kg	12	645.90 ± 34.71	321.670 ± 93.91
	800 mg/kg	11	545.36 ± 57.54 [△]	360.38 ± 72.47
BP	200 mg/kg	8	523.00 ± 37.54 ^{△△}	160.62 ± 13.11 ^{△△}

注:与溶媒对照组比,** $P < 0.01$;与模型组比,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$ 。

2.3 AP 对免疫性肝损伤小鼠血清 TP、Alb 和 A/G 比值的影响 与空白组相比,BCG 联合 LPS 所致的肝损

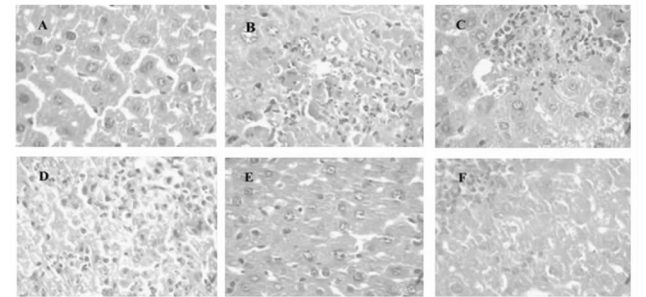
伤可以显著降低小鼠血清 TP、Alb 含量及 A/G 比值($P < 0.01$), AP 200、400 mg/kg 可显著升高血清中 TP 含量($P < 0.05$), AP 400 mg/kg 可显著升高血清中 Alb 含量($P < 0.01$)。结果见表 3。

表 3 AP 对免疫性肝损伤小鼠血清 TP、Alb 和 A/G 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	剂量	例数	TP(g/L)	Alb(g/L)	A/G
溶媒对照组	—	12	63.22 ± 0.83	40.62 ± 0.73	1.84 ± 0.07
BCG + LPS	2.5 mg + 7.5 μg/只	12	50.60 ± 1.11**	30.65 ± 0.46**	1.56 ± 0.05**
AP	200 mg/kg	10	54.19 ± 1.38 [△]	32.73 ± 1.33	1.53 ± 0.06
	400 mg/kg	12	54.85 ± 1.38 [△]	33.91 ± 0.87 ^{△△}	1.63 ± 0.04
	800 mg/kg	11	51.16 ± 0.77	32.04 ± 0.67	1.66 ± 0.08
BP	200 mg/kg	8	52.08 ± 1.66	32.15 ± 1.26	1.61 ± 0.04

注:与溶媒对照组比,** $P < 0.01$;与模型组比,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$ 。

2.4 病理组织学观察 溶媒对照组病理切片光镜下观察可见肝小叶结构正常,肝细胞胞浆饱满(图 1A),等级评价为 0 级(表 4)。BCG 联合 LPS 诱导肝损伤模型组可见肝小叶图像紊乱,结构不清楚,肝细胞嗜酸性变性,炎性细胞浸润严重,并伴有大面积点状或片状坏死(图 1B),等级评价显示模型组损伤程度显著高于溶媒对照组($P < 0.01$)(表 4)。AP 200、400 mg/kg 组可见肝组织出现不同程度凝固性坏死,炎性细胞浸润(图 1C 和图 1D),等级评价与模型组相比无统计学意义(表 4)。AP 800 mg/kg 组肝小叶结构较清晰,炎性细胞浸润减少,肝细胞坏死面积减少,病变程度明显改善(图 1E),等级评价较模型组有显著降低($P < 0.05$)(表 4)。BP 200 mg/kg 肝组织亦可见不同程度凝固性坏死,炎性细胞浸润(图 1F)。



A:溶媒对照组;B:BCG + LPS 组;C - E: AP 200、400、800 mg/kg 组;F:BP 200 mg/kg 组。

图 1 各组小鼠代表性的肝脏 HE 染色图片(×400)

表 4 AP 对免疫性肝损伤小鼠肝组织病理评分的影响

分组	剂量	例数	肝组织病理分级					P
			0	I	II	III	IV	
溶媒对照组	—	12	12	0	0	0	0	
BCG + LPS	2.5 mg + 7.5 μg/只	8	1	2	3	2	0	<0.001
AP	200 mg/kg	11	0	6	4	1	0	
	400 mg/kg	8	3	2	2	1	0	
	800 mg/kg	9	5	4	0	0	0	<0.05
BP	200 mg/kg	8	1	0	4	2	1	

注:与溶媒对照组比, $P < 0.001$;与模型组比, $P < 0.05$ 。

3 讨论

病毒性肝炎、自身免疫性肝炎等肝脏疾病严重威胁人类健康。虽然诱发病因各不相同,但研究显示活化的淋巴细胞所引起的机体异常免疫反应与病毒性肝炎和自身免疫性肝病的病理过程相关,机体免疫应答异常已被公认为是这类疾病发病过程的重要机制之一^[1-2]。以免疫机制诱发的免疫性肝损伤动物实验模型,因能刺激 T 淋巴细胞活化,激活肝内免疫反应,最终导致肝细胞损伤、坏死,可以很好的模拟肝炎病症的免疫病理过程,对病毒性肝炎和自身免疫性肝病的研究具有重要意义^[14]。

BCG 和 LPS 联合作用诱导的小鼠免疫性肝损伤模型是常用的研究病毒性肝炎及保肝药物的经典动物模型^[15-16]。BCG 是一种减毒的活性结核杆菌疫苗,具有抗原性,但不含内毒素,毒性极弱,LPS 为革兰氏阴性菌细胞壁主要成分,BCG 处理后的动物对 LPS 十分敏感,能引发以凋亡为特点的肝细胞损伤。BCG 进入体内能使 T 淋巴细胞致敏,激活肝中巨噬细胞 - Kupffer 细胞,引起 Kupffer 细胞的聚集和肝内浸润,此时给予低剂量 LPS 攻击,可激发这些致敏的细胞向肝中释放对肝细胞有毒性作用的细胞因子 TNF - α、白介素等,从而激活凋亡通路、诱导氧化应激等一系列生物效应,最终导致肝损伤^[17]。本文采用尾静脉注射 BCG 刺激 12 d 后 LPS 诱导攻击的方式制备小鼠免疫性肝损伤模型。小鼠出现肝脾指数、血清中 AST 和 ALT 活性显著增加升高,血清 TP、Alb 含量及 A/G 比值显著降低,肝细胞中度或重度炎性细胞浸润,存在点状、灶性坏死等现象,说明在我们的实验条件下成功制备了小鼠免疫性肝损伤模型。

使用此模型发现 AP 能显著抑制肝脾指数的升高,不同程度地减少肝功能的异常,表现为降低血清中 AST 活性,同时升高血清中 TP 和 Alb 的含量。对肝组织病理变化也有改善作用。本研究首次发现 AP 具有改善免疫性肝损伤的作用。AP 是苹果中多元酚类物

质的总称,主要成分包括黄酮类化合物(儿茶素、表儿茶素、根皮苷、原花青素和槲皮素等),酚酸及羟基酚酸酯(主要为绿原酸和咖啡酸)和糖类衍生物等^[18]。由于 AP 的众多活性都与其强大的清除自由基和抗氧化作用相关^[19-20],推测 AP 改善免疫性肝损伤的作用也可能与其清除自由基和抗氧化作用相关。具体的机制值得深入研究。

对于病毒性肝炎和自身免疫性肝病,阻止发病过程中病程恶化,提高和改善肝功能极为重要,现有的抗病毒药物或免疫抑制剂虽可从致病原因上遏制疾病发展,但在改善肝脏病理状态,维持肝细胞结构,提高肝脏功能等方面并不具有优势,加之不同程度的不良反应,限制了使用人群。AP 是从苹果皮渣中提取的天然产物,安全性高。本研究拓宽了 AP 保肝作用的应用范围,显示出了其良好的应用前景。

参考文献

- [1] Herkel J, Schuchmann M, Tiegs G, et al. Immune-mediated liver injury [J]. *J Hepatol*, 2005, 42(6): 920-923.
- [2] Della Corte C, Sartorelli MR, Comparcola D, et al. Autoimmune liver diseases [J]. *Minerva Pediatr*, 2012, 64(6): 595-606.
- [3] Denis MC, Furtos A, Dudonne S, et al. Apple peel polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53725.
- [4] Bai X, Zhang H, Ren S. Antioxidant activity and HPLC analysis of polyphenol-enriched extracts from industrial apple pomace [J]. *J Sci Food Agric*, 2013, 93(10): 2502-2506.
- [5] Miura D, Miura Y, Yagasaki K. Effect of apple polyphenol extract on hepatoma proliferation and invasion in culture and on tumor growth, metastasis, and abnormal lipoprotein profiles in hepatoma-bearing rats [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(11): 2743-2750.
- [6] Zheng CQ, Qiao B, Wang M, et al. Mechanisms of apple polyphenols-induced proliferation inhibiting and apoptosis in a metastatic oral adenoid cystic carcinoma cell line [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2013, 29(5): 239-245.
- [7] Kojima T, Akiyama H, Sasai M, et al. Anti-allergic effect of apple polyphenol on patients with atopic dermatitis: A pilot study [J]. *Allergol Int*, 2000, 49(1): 69-73.
- [8] Zuercher AW, Holvoet S, Weiss M, et al. Polyphenol-enriched apple extract attenuates food allergy in mice [J]. *Clin Exp Allergy*, 2010, 40(6):

942-950.

- [9] Choi O, Yahiro K, Morinaga N, et al. Inhibitory effects of various plant polyphenols on the toxicity of Staphylococcal alpha-toxin [J]. *Microb Pathog*, 2007, 42(5-6): 215-224.
- [10] Femia AP, Luceri C, Bianchini F, et al. Marie Menard apples with high polyphenol content and a low-fat diet reduce 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats; effects on inflammation and apoptosis [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2012, 56(8): 1353-1357.
- [11] Boque N, de la Iglesia R, de la Garza AL, et al. Prevention of diet-induced obesity by apple polyphenols in Wistar rats through regulation of adipocyte gene expression and DNA methylation patterns [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2013, 57(8): 1473-1478.
- [12] Yang J, Li Y, Wang F, et al. Hepatoprotective effects of apple polyphenols on CCl₄-induced acute liver damage in mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(10): 6525-6531.
- [13] 杨舒淳. 旋覆花苦豆子合剂应用于急性免疫性肝损伤的实验研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2008.
- [14] Dienes HP, Drebbler U. Pathology of immune-mediated liver injury [J]. *Dig Dis*, 2010, 28(1): 57-62.
- [15] Zhang NN, Huang NY, Zhou XK, et al. Protective effects of IL-4 on Bacillus Calmette-Guerin and lipopolysaccharide induced immunological liver injury in mice [J]. *Inflamm Res*, 2012, 61(1): 17-26.
- [16] Jiang C, Jiao Y, Chen X, et al. Preliminary characterization and potential hepatoprotective effect of polysaccharides from *Cipangopaludina chinensis* [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 59: 18-25.
- [17] Wang H, Wei W, Shen YX, et al. Protective effect of melatonin against liver injury in mice induced by Bacillus Calmette-Guerin plus lipopolysaccharide [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(18): 2690-2696.
- [18] Lotito SB, Frei B. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma; contrasting in vitro and in vivo effects [J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 36(2): 201-211.
- [19] Vineetha VP, Girija S, Soumya RS, et al. Polyphenol-rich apple (*Malus domestica* L.) peel extract attenuates arsenic trioxide induced cardiotoxicity in H9c2 cells via its antioxidant activity [J]. *Food Funct*, 2014, 5(3): 502-511.
- [20] Yue T, Shao D, Yuan Y, et al. Ultrasound-assisted extraction, HPLC analysis, and antioxidant activity of polyphenols from unripe apple [J]. *J Sep Sci*, 2012, 35(16): 2138-2145.

(2013-11-12 收稿 责任编辑: 曹柏)