

## 余甘子抗大鼠免疫性肝纤维化作用( I )

李萍<sup>1</sup>, 杨政腾<sup>2</sup>, 彭百承<sup>2\*</sup>, 甄丹丹<sup>3</sup>

(1. 广西中医学院, 南宁 530001; 2. 南宁市中医院, 南宁 530012;  
3. 广西中医学院第一附属医院, 南宁 530012)

**[摘要]** 目的:探讨余甘子对猪血清所致大鼠免疫性肝纤维化的影响。方法:采用大鼠 ip 猪血清,造成大鼠肝纤维化,ig 余甘子提取物,采用放射免疫分析法测定其血清透明质酸(HA)、Ⅲ型前胶原氨基端肽(PⅢNP)、层黏连蛋白(LN)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、L-羟脯氨酸(Hyp)的含量,检测细胞因子肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、软化性因子(TGF- $\beta$ ),探讨余甘子抗免疫性肝纤维化的作用机制。结果:余甘子提取物能减少 TNF- $\alpha$ ,TGF- $\beta$  的含量,减少 HA,PⅢNP,LN,MDA,Hyp 含量,升高 SOD 活性,其作用呈剂量依赖性。结论:余甘子对猪血清致大鼠肝纤维化模型具有较好的抗肝纤维化作用。

**[关键词]** 余甘子;猪血清;免疫性肝纤维化

**[中图分类号]** R 285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)06-0171-03

## Effect of *Phyllanthus emblica* L. on Immunity Hepatic Fibrosis in Rats ( I )

LI Ping<sup>1</sup>, YANG Zheng-teng<sup>2</sup>, PENG Bai-cheng<sup>2\*</sup>, ZHEN Dan-dan<sup>3</sup>

(1. Guangxi College of TCM, Nanning 530001, China; 2. Nanning Hospital of TCM, Nanning 530012, China; 3. The First Hospital, Guangxi College of TCM, Nanning 530012, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of *Phyllanthus emblica* L. on liver fibrosis indexes in liver fibrosis rats caused by porcine serum. **Method:** The rats were injected with porcine serum though intraperitonea to lead to the liver fibrosis, and the rats were given the extraction of *P. emblica*. With the methods of radioimmunity assay, the HA, PⅢNP, LN, SOD, MDA and Hyp were tested at the same time, the TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  were also tested. By doing so, the action mechanisms of *P. emblica* was explored. **Result:** The extraction of *P. emblica* was able to reduce the content of TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , HA, PⅢNP, LN, MDA and Hyp. It also increased the activity of SOD. The actions were in a dose-dependent manner. **Conclusion:** *P. emblica* have a good role in anti-liver fibrosis induced by porcine serum in rats.

**[Key words]** *Phyllanthus emblica*; porcine serum; immunity hepatic fibrosis

前期实验证实了余甘子对猪血清致肝纤维化模型大鼠具有保肝降酶,改善肝脏对蛋白质的合成功能,纠正蛋白倒置,改善肝脏组织病理损伤等作用。该研究进一步探讨余甘子抗免疫性肝纤维化的作用及机制。

### 1 材料与方法

**1.1 动物** SD 大鼠 82 只,体重 180 ~ 220 g,雌雄各半,由广西医科大学实验动物中心提供,动物许可证号 SCXK(桂)2003-0003 号。

**1.2 药品和试剂** 新鲜余甘子,清水洗净,去核取肉,晒干,粉碎过 30 目筛,以 10 倍和 8 倍 70% 乙醇常温浸泡 2 次各 72 h,滤取并合并醇提液,低温回收乙醇,挥发至无醇味,制成 2 g · mL<sup>-1</sup> 流浸膏,分装备用。用时以蒸馏水稀释至所需浓度;秋水仙碱,云南省昆明制药股份有限公司,批号 20070225-1。透明质酸(HA)、层黏连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原氨基端

**[收稿日期]** 2010-01-13

**[基金项目]** 广西科技厅自然科学基金课题(桂科自 0640140)

**[通讯作者]** \* 彭百承, Tel: 13807878505, E-mail: 13807878505@139.com

肽(PⅢNP)放免分析试剂盒,北京北方生物技术研究  
所,批号 20080520;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二  
醛(MDA)测试盒,南京建成生物工程研究所,批号  
20080608;L-羟脯氨酸(Hyp)测试盒,南京建成生  
物工程研究所,批号 20080616;大鼠 TGF-β、TNF-α 放  
免分析试剂盒,上海船夫生物科技有效公司分装,批  
号 20080617。

**1.3 分组及给药方法** 取大鼠 82 只,适应性喂养 1  
周后随机分成 6 组:余甘子高、中、低剂量组(5.0,  
2.5,1.25 g·kg<sup>-1</sup>),秋水仙碱阳性对照组(0.1 mg·  
kg<sup>-1</sup>),模型对照组、正常对照组。正常对照组以  
NaCl 注射液 0.5 mL/只 ip;其余各组均以猪血清 0.5  
mL/只 ip,均 2 次/周,连续 9 周。6 组于分组后第 2 d  
起连续 ig 生理盐水或治疗药物,1 次/d,连续给药 9  
周。末次药后禁食 12 h,麻醉大鼠,腹主动脉采血,

25 °C 放置 4 h 后以 4 °C 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,分  
离血清,3~5 °C 放置待检。

**1.4 指标检测** 采用放射免疫分析法测定大鼠血  
清 HA,PⅢNP, LN 含量;采用黄嘌呤氧化酶法检测  
SOD 的活性;采用改进硫代巴比妥(TBA)比色法检  
测 MDA 的含量;采用碱水解法测定 Hyp 的含量;采  
用酶联免疫吸附试验法测定血清 TNF-α、TGF-β 含  
量。均按试剂盒说明进行。

**1.5 数据处理** 以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异用 *t* 检验。

**2 结果**

**2.1 对免疫性肝纤维化大鼠血清 HA,PⅢNP, LN  
的影响** 结果显示,与正常对照组比较,模型对照组  
大鼠血清 HA、PⅢNP、LN 的水平显著升高(*P* <  
0.01,与模型组比较,余甘子各剂量组均明显降低大  
鼠血清 HA,PⅢNP, LN 水平。(表 1)。

表 1 对免疫性肝纤维化大鼠血清 HA,PⅢNP, LN 的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	<i>n</i>	HA /ng·mL <sup>-1</sup>	PⅢNP /ng·mL <sup>-1</sup>	LN /ng·mL <sup>-1</sup>
正常对照	—	10	140.46 ± 23.16 <sup>2)</sup>	4.03 ± 0.91 <sup>2)</sup>	36.41 ± 4.13 <sup>2)</sup>
模型对照	—	16	320.06 ± 33.84	9.37 ± 1.68	90.06 ± 9.13
余甘子	5.00	14	227.36 ± 24.12 <sup>2)</sup>	6.00 ± 1.83 <sup>2)</sup>	70.29 ± 6.89 <sup>2)</sup>
	2.50	14	256.45 ± 29.55 <sup>2)</sup>	5.73 ± 1.68 <sup>2)</sup>	75.80 ± 9.92 <sup>2)</sup>
	1.25	14	269.87 ± 30.11 <sup>2)</sup>	6.53 ± 1.13 <sup>2)</sup>	62.52 ± 6.59 <sup>2)</sup>
秋水仙碱	1 × 10 <sup>-4</sup>	14	225.88 ± 21.98 <sup>2)</sup>	7.05 ± 1.23 <sup>2)</sup>	64.49 ± 8.04 <sup>2)</sup>

注:与模型对照组比较,<sup>1)</sup> *P* < 0.05, <sup>2)</sup> *P* < 0.01(下同)。

**2.2 对免疫性肝纤维化大鼠血清 SOD, MDA, Hyp  
的影响** 与模型对照组比较,余甘子各剂量组均能

明显降低大鼠血清 MDA, Hyp 的含量,升高 SOD 的  
活性(*P* < 0.01)(表 2)。

表 2 对免疫性肝纤维化大鼠血清 SOD, MDA, Hyp 的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	<i>n</i>	Hyp /μg·mL <sup>-1</sup>	SOD /U·mL <sup>-1</sup>	MDA /nmol·mL <sup>-1</sup>
正常对照	—	10	10.14 ± 2.34 <sup>2)</sup>	210.97 ± 3.92 <sup>2)</sup>	6.40 ± 1.19 <sup>2)</sup>
模型对照	—	16	29.31 ± 3.62	69.45 ± 4.80	20.30 ± 2.13
余甘子	5.00	14	13.38 ± 2.81 <sup>2)</sup>	181.51 ± 4.75 <sup>2)</sup>	7.68 ± 1.27 <sup>2)</sup>
	2.50	14	15.55 ± 3.74 <sup>2)</sup>	182.07 ± 1.88 <sup>2)</sup>	11.71 ± 1.55 <sup>2)</sup>
	1.25	14	15.43 ± 1.58 <sup>2)</sup>	182.70 ± 2.95 <sup>2)</sup>	12.01 ± 1.61 <sup>2)</sup>
秋水仙碱	1 × 10 <sup>-4</sup>	14	13.64 ± 2.94 <sup>2)</sup>	191.29 ± 5.11 <sup>2)</sup>	11.07 ± 2.01 <sup>2)</sup>

**2.3 对免疫性肝纤维化大鼠血清 TNF-α、TGF-β 含  
量的影响** 结果显示,与模型对照组比较,余甘子各

剂量组血清的 TNF-α 和 TGF-β 水平明显降低(*P* <  
0.01)(表 3)。

表 3 对免疫性肝纤维化大鼠血清 TNF-α、TGF-β 含量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	<i>n</i>	TNF-α/pg·mL <sup>-1</sup>	TGF-β/mg·L <sup>-1</sup>
正常对照	—	10	26.49 ± 4.65 <sup>2)</sup>	14.46 ± 3.15 <sup>2)</sup>
模型对照	—	16	94.17 ± 9.90	33.94 ± 5.05
余甘子	5.00	14	37.97 ± 7.65 <sup>2)</sup>	18.18 ± 1.36 <sup>2)</sup>
	2.50	14	45.90 ± 6.91 <sup>2)</sup> △	18.03 ± 0.76 <sup>2)</sup>
	1.25	14	50.27 ± 7.12 <sup>2)</sup> △	20.25 ± 2.18 <sup>2)</sup>
秋水仙碱	1 × 10 <sup>-4</sup>	14	46.59 ± 6.47 <sup>2)</sup>	17.53 ± 1.45 <sup>2)</sup>

### 3 讨论

血清 HA, LN, PⅢNP 是反映肝纤维化活动程度的重要指标。当肝细胞受损时,各种细胞因子及细胞外基质(ECM)本身的破坏可激活 LN 的合成,故 LN 的升高程度与肝纤维化程度成正相关。HA 是一种由间质细胞合成的大分子糖胺多糖,主要由 HSC 产生,经淋巴细胞进入血液循环,分布在各种结缔组织中,除少量滞留于脾脏、淋巴结核骨髓外,大多数由肝窦内皮细胞摄取并降解为乙酸和乳酸。血清 HA 水平是反映肝损伤严重程度、判断有无活动性肝纤维化和肝硬化的定量指标。PCⅢ作为Ⅲ型胶原的前体主要在活化的 HSC 合成与释放,其含量可直接反映Ⅲ型胶原代谢及肝纤维化早期病变,其水平的高低可作为慢性肝组织炎症坏死、纤维化程度和肝纤维化、肝硬化诊断的重要指标<sup>[1-2]</sup>。在实验研究中作者发现,余甘子能显著降低 HA, LN, PⅢNP 的含量,说明其具有明显的抗免疫性肝纤维化作用。

在各种诱因引起的肝纤维化中,外源性或细胞代谢所产生的氧自由基是诱发肝细胞损伤、促使肝纤维化形成的主要原因之一。本实验结果证实,余甘子提取物能明显降低 MDA 水平,同时显著提高 SOD 活性,提示其对肝纤维化的阻抑作用与其显著的抗组织氧化应激和脂质过氧化损伤密切相关。

TNF- $\alpha$  在肝纤维化中的发生发展中占重要地位,在肝纤维化进程中,TNF- $\alpha$  刺激脂肪细胞等的胶体合成,加速 TGF- $\beta$  对 HSC 的转化,促进其糖胺多糖、纤维连接素等基质的合成;通过 TNF 受体和不同的细胞受体蛋白结合,激活过氧化物酶体增生物

激活受体  $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ ) 磷酸化,从而使得 PPAR- $\gamma$  转录活性下降,最终导致肝纤维化<sup>[3-4]</sup>。TGF- $\beta$  是一种多向性、多效性和多功能性的细胞因子。ECM 的合成与降解主要由 TGF- $\beta$  调控。TGF- $\beta$  是肝纤维化形成的始动因子<sup>[5-6]</sup>。本实验研究结果表明,余甘子提取物能够减少 TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  的含量。其机制可能是余甘子抑制 TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  的表达,从而抑制贮脂细胞的活化和合成胶原,或者抑制胶原酶的活性而发挥其抗肝纤维化作用。

综上所述,余甘子对猪血清所致大鼠肝纤维化模型具有较好的抗纤维化作用,其作用机制可能与其减少氧自由基、抑制细胞膜脂质过氧化反应、减少炎症因子释放等有关。

### [参考文献]

- [1] 张斌. 肝纤维化的发病机理研究进展[J]. 现代诊断与治疗, 2004, 15(6): 355.
- [2] 白宇宁, 刘绍能. 中医药抗肝纤维化的研究概况[J]. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(8): 74.
- [3] 刘成海. 肝纤维化的基础研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(1): 11.
- [4] 林羨屏, 王小众. 肝纤维化相关因子及其作用[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(11): 1037.
- [5] 夏金荣, 林春生. 肝星状细胞与肝纤维化[J]. 临床荟萃, 2006, 21(12): 907.
- [6] 赵瑞皎, 张锦生. 细胞外基质对肝内细胞的影响[J]. 国外医学·生理、病理科学与临床分册, 2000, 20(5): 374.

[责任编辑 何伟]