

山芝麻水提取物对小鼠免疫性肝损伤的保护作用

林兴¹, 黄权芳^{2*}, 张士军¹, 黄仁彬¹ (1.广西医科大学, 南宁 530021; 2.广西中医学院第一附属医院, 南宁 530023)

摘要: 目的 观察山芝麻水提取物对小鼠免疫性肝损伤的保护作用。方法 将 60 只小鼠随机分为正常对照组、模型组、日达仙阳性对照组($4.2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), 以及山芝麻高、中、低剂量组(20, 10, $5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), 各组预防性给药 15 d, 除正常对照组外, 其余各组小鼠尾静脉注射 $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 刀豆蛋白 A(Con A)。12 h 后测定血清谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)的活性, 流式细胞术测定全血中 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ T 细胞亚群比率, ELISA 方法测定血清肿瘤坏死因子(TNF- α)和 γ 干扰素(IFN- γ)的水平。结果 与模型组比较, 10, $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 剂量的山芝麻能明显降低 Con A 介导的肝损伤小鼠血清中 AST、ALT 的水平, 显著提高 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ 比率, 明显降低血清中炎症细胞因子 IFN- γ 和 TNF- α 的含量。结论 山芝麻水提取物对免疫性肝损伤具有保护作用, 其机制可能与调整 T 细胞亚群的活性和减少炎症细胞因子的作用有关。

关键词: 山芝麻; 免疫性肝损伤; T 淋巴细胞亚群; 刀豆蛋白 A

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)01-0001-05

Protective Effect of the Water Extract from *Helicteres Angustifolia* on Immunological Liver Injury in Mice

LIN Xing¹, HUANG Quanfang^{2*}, ZHANG Shijun¹, HUNAG Renbin¹ (1. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangxi Traditional Chinese Medicine University, Nanning 530023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the protective effect of the water extract from *Helicteres angustifolia* (WEHA) on immunological liver injury in mice. **METHODS** Sixty mice were randomly divided into normal group, model group, Zadaxi group ($4.2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), and high, medium, low-dose WEHA-treated group ($20, 10, 5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). The normal and model groups were given normal saline orally, all mice in other groups were given the corresponding drugs. After 15 d, beside mice in normal group, other groups were injected with concanavalin A (Con A) $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ via the tail vein to damage mice's liver. Using automatic biochemical analyzer, the alanine aminotransferase(ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum were examined. The percentage of T lymphocyte subsets CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ cells were detected in plasma by a flow cytometer, using ELISA for determination of the serum cytokines: interferon-gamma (IFN- γ) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α). **RESULTS** Compared with model group, 10, $20 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ -dose WEHA could significantly decrease the activity of AST and ALT, increase percentage of CD_3^+ 、 CD_4^+ cell and $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$. And WEHA also could significantly reduce the inflammatory cytokines IFN- γ and TNF- α level. **CONCLUSION** The water extract from *Helicteres angustifolia* is effective in protecting immunological liver injury in mice induced by Con A and this mechanism maybe closely associated with its action in regulating the T-cell subsets and reducing the inflammatory cytokines.

KEY WORDS: *Helicteres angustifolia*; hepatic damage; T lymphocyte subpopulation; concanavalin-A

山芝麻系梧桐科植物山芝麻 (*Helicteres angustifolia* L.) 的根, 能清热解毒, 主要用于感冒发热、肺热咳嗽、咽喉肿痛、麻疹等^[1]。至今, 对山芝麻公开报道的研究主要集中在其化学成分的分离、鉴定方面, 其药效学研究很少。笔者前期

研究表明, 山芝麻能保护 CCl_4 所致小鼠肝损伤, 具有显著的抗脂质过氧化作用^[2]; 此外, 山芝麻还可明显提高 SOD 活性, 降低肝纤维化大鼠血清 MDA、HyP、HA 和 TIMP-1 含量^[3]; 能显著改善肝纤维化大鼠的肝脏组织结构, 减轻肝纤维化,

基金项目: 广西教育厅自然科学基金项目(200911MS28); 广西地方性高发疾病防治研究重点实验室基金项目(桂科能 0842009-Z11)

作者简介: 林兴, 男, 硕士, 副教授 Tel: (0771)5358342 E-mail: gxLx60@163.com *通信作者: 黄权芳, 女, 硕士, 主管中药师 Tel: (0771)5645433 E-mail: hqf00@163.com

其机制可能与降低 α -SMA、TIMP-1 蛋白表达^[4]和抑制 Col I 有关^[5]。笔者最近的研究还发现, 山芝麻水提液对 HepG2.2.15 细胞 HBsAg 和 HBeAg 具有明显地抑制作用, 且毒性较低, 提示其可能有良好的治疗 HBV 的潜在作用^[6]。本实验是前期系列研究的延续, 采用刀豆蛋白 A(Con A)造成免疫性肝损伤小鼠模型, 观察山芝麻对小鼠免疫性肝损伤的保护作用, 为揭示山芝麻抗 HBV 的作用机制提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

昆明种小鼠, SPF 级, ♂ ♀ 各半, 体重 22~26 g, 实验动物使用许可证号: SYKG 桂 2003-0005; 实验动物生产许可证号: SCXKG 桂 2003-0003; 由广西医科大学实验动物中心提供。

1.2 受试药品

山芝麻, 秋季采于广西南宁市郊区, 经广西中医学院第一附属医院黄权芳中药师鉴定为梧桐科植物山芝麻 *Helicteres angustifolia* L. 的根。山芝麻水提取物(the water extract from *Helicteres angustifolia*, WEHA)由广西医科大学医学科学实验中心自行提取。

1.3 阳性对照品

日达仙(注射用胸腺肽 $\alpha 1$, 美国赛生氏公司, 1.6 mg 溶于 77 mL 无菌生理盐水, 备用)。

1.4 仪器与试剂

流式细胞仪(美国 BD 公司, 型号: BD Influx)。

T 淋巴细胞亚群试剂盒(CD₃-FITC、CD₄-PE、CD₈-TC 荧光素标记的单克隆抗体), 美国 Caltag 公司。ALT、AST 试剂盒(南京建成生物工程研究所)。小鼠肿瘤坏死因子(TNF- α)、小鼠干扰素(IFN- γ) ELISA 试剂盒, 均来自深圳达科为生物科技有限公司。

2 方法

2.1 分组及造模

将 60 只昆明种小鼠随机分为正常对照组(Normal), 模型组(Model), 日达仙阳性对照组(Zadaxi, 4.2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 山芝麻高剂量组(WEHA_H, 20 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、中剂量组(WEHA_M, 10 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、低剂量组(WEHA_L, 5 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 每组 10 只。各给药组灌胃(按每 10 g 给药 0.2 mL)给予相应药物, 正常对照组和模型组灌胃给予等量生理盐水, 每日 1

次, 15 d 后, 除正常对照组外, 其余各组均尾静脉注射 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ConA^[7], 禁食 12 h 后, 全部动物摘眼球取全血, 部分血肝素抗凝, 部分血液分离血清-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

2.2 ALT、AST 活性测定

分离小鼠血清, 按试剂盒说明书, 检测 ALT、AST 活性。

2.3 T 细胞亚群检测

①取 CD₃-FITC 和 CD₄-PE 各加入 50 μL 全血; 另一试管中取 CD₃-FITC 和 CD₈-TC 各加入 50 μL 全血, 暗处孵育 15 min。②每管加入 450 μL 红细胞溶解液。③暗处孵育 15 min。④1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清。⑤沉淀加 0.5 mL PBS, 重新悬浮。⑥过 300 目尼龙网。⑦上机检测。⑧用 Cellquest 软件分析散点图。

2.4 血清 TNF- α 和 IFN- γ 含量测定

取血清, 采用 ELISA 法检测 TNF- α 、IFN- γ , 即分别向 TNF- α 和 IFN- γ 单抗包被的 96 孔 PVC 板每孔加入标准品稀释液或待检样本 100 μL , 并设空白对照和标准曲线孔, 各试剂稀释浓度和步骤按试剂盒操作说明进行, 终止反应后即酶标仪均于 450 nm 处测定相应的吸光度(A)值, 绘制标准曲线, 根据标准曲线方程求得样品值($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

3 结果

3.1 对小鼠血清 ALT、AST 活性的影响

模型组小鼠血清中 AST、ALT 活性较正常对照组明显升高, 提示造模成功; 与模型组比较, 山芝麻高、中剂量组和日达仙阳性对照组 AST、ALT 活性明显降低, 而山芝麻低剂量组 AST、ALT 活性的降低无统计学意义。说明山芝麻对 AST、ALT 的影响呈明显的剂量依赖性, 结果见表 1。

表 1 山芝麻对免疫性肝损伤小鼠血清 AST、ALT 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab 1 Effect of WEHA on serum ALT and AST activities of immunological hepatic injured mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹
正常对照组	118.7 $\pm$ 48.9 ²⁾	84.4 $\pm$ 22.8 ²⁾
模型组	479.5 $\pm$ 121.4	208.3 $\pm$ 99.8
阳性对照组	189.3 $\pm$ 83.5 ²⁾	79.9 $\pm$ 34.1 ²⁾
山芝麻低剂量组	379.6 $\pm$ 117.1	159.2 $\pm$ 83.7
山芝麻中剂量组	358.5 $\pm$ 109.9 ¹⁾	126.4 $\pm$ 62.6 ¹⁾
山芝麻高剂量组	223.3 $\pm$ 92.8 ²⁾	109.6 $\pm$ 75.4 ²⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$; ²⁾ $P<0.01$

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$; ²⁾ $P<0.01$

3.2 对免疫性肝损伤小鼠 T 淋巴细胞亚群的影响

模型组小鼠全血中 CD_3^+ 、 CD_4^+ 比率较正常对照组明显下降, 而 CD_8^+ 显著上升; 与模型组比较, 山芝麻高、中剂量组和日达仙阳性对照组外周血 CD_3^+ 和 CD_4^+ T 细胞百分率及 CD_4^+/CD_8^+ 比值明显高于模型组, 而 CD_8^+ T 细胞百分率明显低于模型组。提示一定剂量的山芝麻能提高外周血 T 淋巴细胞亚群(CD_3^+ 、 CD_4^+ 和 CD_4^+/CD_8^+)的比率, 减少其向肝脏的浸润, 从而减小其细胞毒性作用对肝细胞的损伤, 结果见表 2 和图 1。

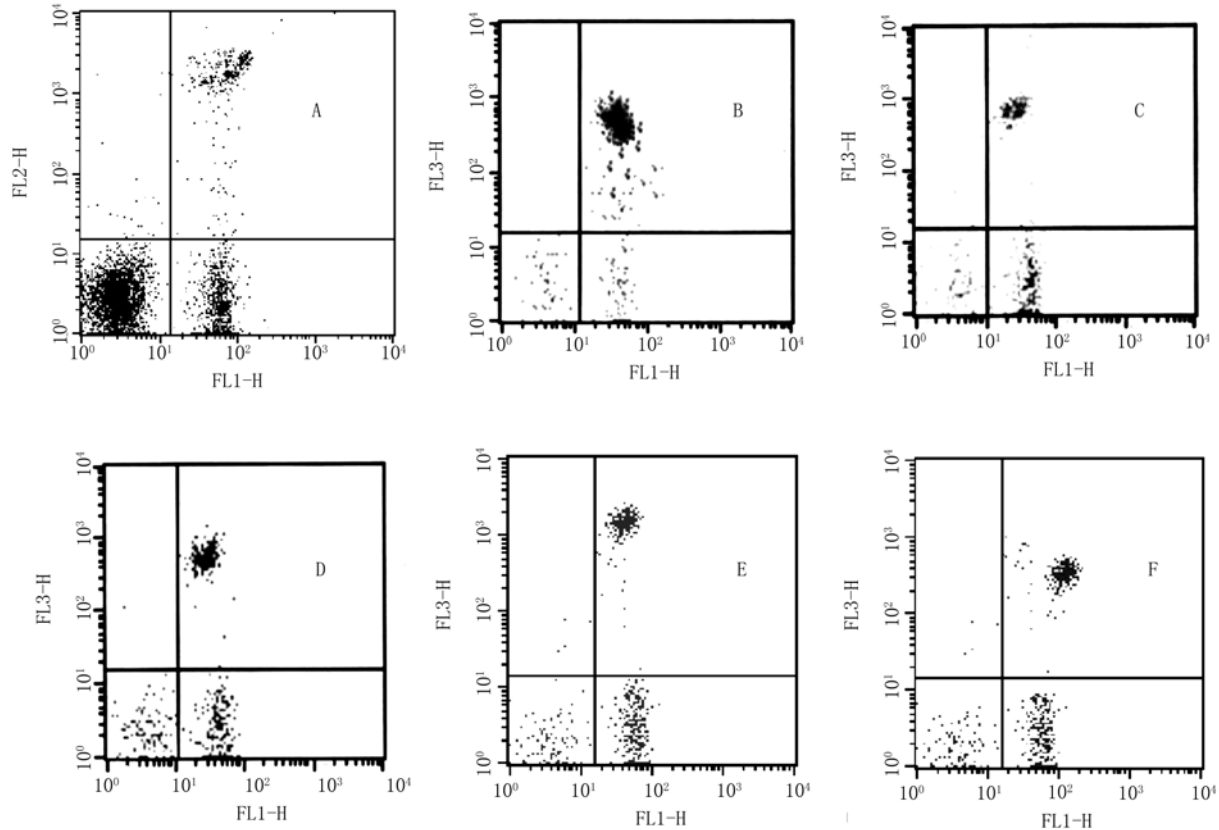


图 1 山芝麻对小鼠 T 淋巴细胞亚群 CD_3^+ 、 CD_4^+ 和 CD_8^+ 影响的流式细胞图

A-正常对照组; B-模型组; C-阳性对照组; D-山芝麻低剂量组; E-山芝麻中剂量组; F-山芝麻高剂量组, 各组流式细胞图中左下象限为 CD_3^+ T 淋巴细胞, 右下象限为 CD_4^+ T 淋巴细胞; 右上象限为 CD_8^+ T 淋巴细胞

Fig 1 Effect of WEHA on T lymphocyte subpopulation

A-Normal; B-Model; C-WEHA L; D-WEHA M; E-WEHA H; F-Zadaxi; the left lower quadrant: CD_3^+ ; bottom right quadrant: CD_4^+ ; right upper quadrant: CD_8^+

3.3 对小鼠血清 TNF- α 和 IFN- γ 含量的影响

模型组小鼠血清 IFN- γ 、TNF- α 含量较正常对照组明显升高; 与模型组比较, 山芝麻高剂量组和日达仙阳性对照组 IFN- γ 、TNF- α 含量明显降低, 而山芝麻中、低剂量组含量的降低无统计学意义。提示一定剂量的山芝麻通过减少炎性细胞因子从而减轻炎性细胞因子对肝细胞的损伤作用, 结果见表 3。

表 2 山芝麻对免疫性肝损伤小鼠 T 淋巴细胞亚群的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab 2 Effect of WEHA on T lymphocyte subpopulation of immunological hepatic injured mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	$CD_3^+/\%$	$CD_4^+/\%$	$CD_8^+/\%$	$CD_4^+/CD_8^+/\%$
正常对照组	73.9 $\pm$ 10.2 ²⁾	50.9 $\pm$ 5.2 ²⁾	18.6 $\pm$ 6.0 ²⁾	2.68 $\pm$ 0.49 ²⁾
模型组	20.5 $\pm$ 6.8	17.2 $\pm$ 4.5	43.3 $\pm$ 8.5	0.37 $\pm$ 0.08
阳性对照组	42.7 $\pm$ 8.1 ²⁾	36.7 $\pm$ 5.9 ²⁾	27.5 $\pm$ 6.1 ²⁾	1.29 $\pm$ 0.28 ²⁾
山芝麻低剂量组	23.2 $\pm$ 4.7	20.3 $\pm$ 7.6	41.0 $\pm$ 8.3	0.43 $\pm$ 0.10
山芝麻中剂量组	28.3 $\pm$ 5.6 ¹⁾	23.6 $\pm$ 6.2 ¹⁾	37.5 $\pm$ 8.6	0.58 $\pm$ 0.12 ²⁾
山芝麻高剂量组	35.8 $\pm$ 9.2 ²⁾	27.8 $\pm$ 7.7 ²⁾	34.3 $\pm$ 7.9 ¹⁾	0.79 $\pm$ 0.27 ²⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$; ²⁾ $P<0.01$

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$; ²⁾ $P<0.01$

4 讨论

免疫性肝损伤典型病理组织学特征是汇管区大量浆细胞浸润并向周围肝实质侵入, 其可由痤疮丙酸杆菌联合脂多糖、卡介苗联合脂多糖、Con A 和肝细胞膜特异性脂蛋白等生物制品诱发。其中, Con A 诱发的小鼠免疫性肝损伤模型被认为是研究人类病毒性肝炎和自身免疫性肝病最适合的模型^[8]。Con A 静脉注射小鼠体内后, 大部分在肝

表3 山芝麻对免疫性肝损伤小鼠血清 TNF- α 和 IFN- γ 的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab 3 Effect of WEHA on serum TNF- α and IFN- γ level of immunological hepatic injured mice($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	TNF- α /pg·mL ⁻¹	IFN- γ /pg·mL ⁻¹
正常对照组	20.65 $\pm$ 9.38 ²⁾	11.32 $\pm$ 4.11 ²⁾
模型组	172.29 $\pm$ 90.16	58.94 $\pm$ 23.51
阳性对照组	85.53 $\pm$ 34.09 ²⁾	23.09 $\pm$ 14.18 ²⁾
山芝麻低剂量组	158.25 $\pm$ 77.23	53.12 $\pm$ 17.29
山芝麻中剂量组	139.33 $\pm$ 80.34	45.83 $\pm$ 13.14
山芝麻高剂量组	100.25 $\pm$ 51.03 ¹⁾	29.62 $\pm$ 10.55 ²⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$; ²⁾ $P<0.01$

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$; ²⁾ $P<0.01$

脏内聚集,并活化体内的 T 细胞,使 T 细胞聚集于肝窦状隙,释放促炎症因子,诱导肝脏损伤。肝细胞损伤较为敏感的检测指标是 ALT、AST,当肝细胞受损伤(如肝炎)时细胞膜破裂,ALT、AST 进入血中引起血清中酶活力增高,从而指示肝脏疾病的进程。本研究显示,小鼠静脉注射 Con A 12 h 后,ALT、AST 水平均明显升高,表明 Con A 引起的免疫肝损伤造模成功。10, 20 g·kg⁻¹ 给药剂量的山芝麻水提取物能够显著降低肝损伤小鼠血清转氨酶 ALT、AST 活性,说明一定剂量的山芝麻对免疫性肝损伤具有明显的保护作用。

许多研究表明,肝内免疫反应是引起肝损伤的重要机制之一,在乙肝发病过程中引起肝细胞损伤和破坏的直接因素是 T 细胞介导的细胞毒性免疫反应^[9]。T 淋巴细胞作为免疫效应细胞和免疫调节细胞,在机体的细胞免疫和体液免疫诱导中均有重要作用。外周血 T 细胞亚群是公认的反应细胞免疫状态较好的指标。根据 T 细胞表面分化抗原的不同,T 细胞可以分为 CD₃⁺、CD₄⁺、CD₈⁺T 淋巴细胞亚群。其中 CD₃⁺包括外周所有成熟 T 细胞,代表细胞免疫的总体水平,因而,CD₃⁺T 是外周血中代表成熟 T 淋巴细胞最好标志物之一。CD₄⁺细胞代表辅助 T 细胞(Th),CD₈⁺细胞代表杀伤性 T 细胞(Ts),二者在体内维持一定的比例,共同参与免疫应答过程。外周血 T 淋巴细胞亚群 CD₃⁺、CD₄⁺、CD₈⁺绝对数和 CD₄⁺/CD₈⁺比值反映了机体细胞的免疫状态^[10]。本研究显示,山芝麻 10, 20 g·kg⁻¹ 可增加免疫性肝损伤小鼠外周血 CD₃⁺和 CD₄⁺T 细胞百分率,降低 CD₈⁺T 细胞百分率,升高 CD₄⁺/CD₈⁺比值,提示山芝麻可增强免疫性肝损伤小鼠的细胞免疫功能。

近年研究发现,T 淋巴细胞的激活在整个肝损

伤发生过程中起了核心的调节作用。一方面激活的淋巴细胞自身可诱导肝细胞的损伤;另一方面淋巴细胞可通过释放炎症细胞因子损伤肝细胞,从而恶化肝损伤。由 T 淋巴细胞产生的炎症细胞因子则是引起持续的肝细胞损伤及维持和扩大炎症反应的重要分子。T 淋巴细胞活化后产生的 IFN- γ 是巨噬细胞的重要激活剂,对促进肝内 Kupffer 细胞参与炎症反应和刺激巨噬细胞分泌 TNF- α 起重要作用^[11]。炎症细胞因子还可以通过死亡配体和受体的相互作用诱导肝细胞的凋亡和坏死^[12]。本实验细胞因子含量检测结果显示,20 g·kg⁻¹ 给药剂量的山芝麻水提取物可以显著降低模型组小鼠血清中已经升高 IFN- γ 、TNF- α 因子的含量,提示一定剂量的山芝麻可以减弱肝损伤的炎症反应。

综上所述,山芝麻水提取物对 Con A 引起的免疫性肝损伤具有明显的保护作用,其可能的机制为:一方面提高了外周血 T 淋巴细胞亚群 CD₃⁺、CD₄⁺、CD₄⁺/CD₈⁺细胞的比率,即通过调节 T 细胞亚群间相互平衡,使机体恢复正常免疫活性;另一方面通过减少 IFN- γ 等炎症细胞因子的大量释放,同时抑制 Kupffer 细胞活化而减少 TNF- α 释放,抑制肝损伤的发生,来发挥抗肝损伤的作用。

REFERENCES

- [1] GAO Y J, SU D, MEI Q X. Research progress in *Helicteres angustifolia* [J]. China Pharm (中国药业), 2009,18(6): 88-90.
- [2] LIN X, HUANG Q F, ZHANG S J, et al. Influence of water extract from *Helicteres angustifolia* on lipid peroxidation induced by carbon tetrachloride in mice [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2010, 16(10): 147-149.
- [3] LIN X, HUANG Q F, ZHANG S J, et al. Influence of the water extract from *Helicteres angustifolia* on serum makers in rats with hepatic fibrosis [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2010, 21(12): 3085-3086.
- [4] LIN X, FENG Z Q, LU E Y, et al. Influence of the water extract from *Helicteres angustifolia* on protein expression of α -SMA, TIMP-1 in rats with hepatic fibrosis [J]. Shandong Med J(山东医药), 2010, 50(7): 46-47.
- [5] LIN X, HUANG Q F, ZHANG S J, et al. Effects of the extract of *Helicteres angustifolia* on Col I mRNA and Col I protein expressions in hepatic tissue of rats with hepatic fibrosis [J]. J Chin Pharm(中国药房), 2010, 21(43): 4041-4043.
- [6] HUANG Q F, LIN X, ZHANG S J, et al. Inhibitory effect of water extracts from *Helicteres angustifolia* on HBsAg and HBeAg in the HepG2.2.15 cells [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(7): 594-597.
- [7] YU F. Protective effects of *Angelica sinensis* polysaccharide on immunological liver injury induced by concanavalin A in mice [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2009, 32(10): 1580-1583
- [8] YONEDA M, WADA K, KATAYAMA K, et al. A novel

- therapy for acute hepatitis utilizing dehydroepiandrosterone in the murine model of hepatitis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68(11): 2283-2289.
- [9] SEINOK I, KAYAGAKI N, TAKEDA K, et al. Contribution of fas ligand to T-cell-mediated hepatic injury in mice [J]. *Gastroenterology*, 1997, 113(4): 1315-1322.
- [10] ABBAS A K, MURPHY K M, SHERA, et al. Functional diversity of helper T lymphocytes [J]. *Nature*, 1996, 383(6603): 787-793.
- [11] TRAUTWEIN C, AKEMANN T, BRENNER D A, et al. Concanavalin A induced liver cell damage: activation of intracellular pathways triggered by tumor necrosis factor in mice [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114(5): 1035-1045.
- [12] GUILHO S, MILLER T, CORNMAN G, et al. Apoptosis induced by tumor necrosis factor- α in rat hepatocyte cell lines expressing hepatitis B virus [J]. *Am J Pathol*, 1996, 148(3): 801-814.

收稿日期: 2011-03-22