

基于 Keap1/Nrf2 信号通路研究紫檀芪对对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用

芦雅丽¹, 萨日娜^{1,2}, 魏立晓¹, 吴树金^{1*}, 葛斌¹(1.甘肃省人民医院药剂科, 兰州 730000; 2.北京中医药大学, 北京 100029)

摘要: 目的 观察紫檀芪(pterostilbene, PTE)对对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用, 并探讨相关机制。方法 利用 APAP(250 mg·kg⁻¹)制备小鼠急性肝损伤模型, PTE 分别给予 15, 30, 60 mg·kg⁻¹, 连续灌胃 15 d 预保护。自动生化分析仪检测谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、总蛋白(total protein, TP)、白蛋白(albumin, Alb)并计算白球比(Alb/Glb, A/G); 苏木精-伊红(HE)染色法进行肝组织病理学检测并进行分级评价; 试剂盒检测超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平; JC-1 检测线粒体膜电位; TUNEL 染色法检测肝细胞凋亡情况; Western blotting 检测 Bax、cytochrome C、转录因子 NF-E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor-2, Nrf2)、Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)的蛋白表达情况。结果 与 APAP 模型组相比, 不同浓度 PTE 组小鼠血清 ALT、AST 值显著降低($P<0.01$), Alb、TP 及 A/G 比值显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 肝组织病理损伤分级降低; 肝组织 SOD、GSH 显著升高($P<0.01$), MDA 显著降低($P<0.01$); 线粒体膜电位增加($P<0.01$); TUNEL 染色结果显示 PTE 组小鼠肝细胞凋亡明显减少; PTE 组与 APAP 模型组相比, 细胞质中的 Bax 表达显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$), cytochrome C 表达显著降低($P<0.01$), 而对应的线粒体中 Bax 表达显著降低($P<0.01$), cytochrome C 表达显著增加($P<0.01$), 同时伴有肝组织总的 Nrf2 表达增加($P<0.01$), Keap1 表达降低($P<0.01$), 细胞质 Nrf2 表达增加($P<0.01$), 细胞核 Nrf2 表达增加($P<0.01$)。结论 PTE 可以保护 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤, 其机制可能与 PTE 上调 Nrf2 水平, 抑制氧化应激, 保护线粒体功能有关。

关键词: 紫檀芪; 对乙酰氨基酚; 急性肝损伤; Keap1/Nrf2; 线粒体

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)17-2079-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.17.005

引用本文: 芦雅丽, 萨日娜, 魏立晓, 等. 基于 Keap1/Nrf2 信号通路研究紫檀芪对对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(17): 2079-2087.

Protective Effect of Pterostilbene Against Acetaminophen-induced Acute Liver Injury in Mice Based on Keap1/Nrf2/Mitochondria Pathway

LU Yali¹, SA Rina^{1,2}, WEI Lixiao¹, WU Shujin^{1*}, GE Bin¹(1.Department of Pharmacy, Gansu Province Hospital, Lanzhou 730000, China; 2.Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the protective effect of pterostilbene(PTE) on acute liver injury induced by acetaminophen(APAP) in mice, and to explore related mechanisms. **METHODS** Acute liver injury model of mice was established by APAP(250 mg·kg⁻¹), PTE was given 15, 30, 60 mg·kg⁻¹ by intragastric for 15 d pre-protection. The serum levels of alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST), total bilirubin(TP) and albumin(Alb) were determined by automatic biochemical analyzer and the albumin/globulin(A/G) ratio was calculated. The liver tissue was stained by hematoxylin-eosin(HE) staining and liver histopathology detection and grading evaluation were calculated. The superoxide dismutase(SOD), reduced glutathione(GSH), malondialdehyde(MDA) level were assayed by related kits. The mitochondrial membrane potential was measured by JC-1. Apoptosis of hepatic cell were detected by TUNEL staining. The protein expressions of Bax, cytochrome C, nuclear factor erythroid 2-related factor-2(Nrf2) and Kelch-like ECH-associated protein 1(Keap1) were detected by Western blotting. **RESULTS** Compared with APAP model group, the serum ALT and AST values of mice in different concentrations of PTE group were significantly reduced($P<0.01$), and Alb, TP and A/G ratio were significantly increased($P<0.05$ or $P<0.01$); the histopathological grade of liver damage reduced; the SOD, GSH level of liver tissue significantly increased($P<0.01$), and MDA level significantly decreased($P<0.01$); moreover, the mitochondrial membrane potential increased($P<0.01$); TUNEL staining results showed that apoptosis of hepatocytes was significantly reduced in PTE group. Compared with APAP model group, the protein expression of cytoplasmic Bax in PTE group was significantly increased($P<0.05$ or $P<0.01$) while cytochrome C significantly decreased($P<0.01$), the expression of Bax in the corresponding mitochondria was significantly decreased($P<0.01$), cytochrome C significantly increased($P<0.01$). The whole Nrf2 protein

基金项目: 甘肃省自然科学基金项目(21JR1RA022)

作者简介: 芦雅丽, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0931)8281754 E-mail: cherrydong2014@163.com *通信作者: 吴树金, 女, 硕士, 副主任药师 Tel: (0931)8281754 E-mail: drug73@163.com

expression was increased($P<0.01$) while the Keap1 decreased($P<0.01$), what's more, the expression of nuclear Nrf2 increased($P<0.01$) and the expression of cytoplasmic Nrf2 increased($P<0.01$). **CONCLUSION** PTE can protect APAP-induced acute liver injury. The mechanism may be related to the up-regulation of Nrf2 level, inhibition of oxidative stress and protected the mitochondrial function by PTE.

KEYWORDS: pterostilbene; acetaminophen; acute liver injury; Keap1/Nrf2; mitochondria

大剂量摄入对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)是临床常见药物性肝损伤的原因,其致肝损伤的主要病理学改变为大量肝细胞的坏死,分子基础则为 APAP 在体内经过细胞色素 P450 系统的代谢产物 *N*-乙酰-对苯醌亚胺(*N*-acetyl-p-benzoquinoneimine, NAPQI)^[1]。线粒体是 NAPQI 的主要靶标^[2-3],是最早发生形态学和功能改变的细胞器之一,一方面过量的 NAPQI 通过半胱氨酸残基结合到线粒体膜蛋白上形成 APAP 复合物,改变线粒体膜结构,导致线粒体呼吸功能抑制,膜通透性增加,膜电位崩溃,线粒体功能障碍最终导致大量肝细胞坏死;另一方面, NAPQI 不仅通过耗竭还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)来破坏肝脏氧化还原平衡,同时其还显著抑制机体抗氧化相关基因的转录,尤其体内主要的转录因子 NF-E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid-2 related factor, Nrf2)的表达,导致肝脏的抗氧化防御系统崩溃,大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生,又极易诱导线粒体膜脂质化,造成线粒体功能损伤,而细胞中 80%的 ROS 都来自线粒体,线粒体结构和功能的完整有助于线粒体固有的 ROS 防御系统发挥作用,线粒体功能损伤反过来又诱导大量 ROS 产生,从而形成负反馈,加速 APAP 肝损伤的进展,因此探究基于氧化应激/线粒体功能保护作用的药物对于 APAP 所致肝损伤的治疗具有重要意义。

紫檀芪(pterostilbene, PTE)(3,5-二甲氧基-4'-羟基二苯乙烯)是来源于蓝莓、紫檀等植物中的有效成分,是白藜芦醇(3,5,4'-三羟基二苯乙烯)甲基化衍生物,其结构上含有的 2 个甲氧基增强了亲脂性和稳定性,较白藜芦醇具有更好的药理活性和抗氧化活性^[4-5]。PTE 为非黄酮类的多酚化合物,除化学结构中羟基可以清除过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)、超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)等氧自由基而使其具有较强的抗氧化作用外,研究表明 PTE 强抗氧化活性主要与其促进 Nrf2 的活性有关, PTE 被认为是 Nrf2 的天然配体^[6],通过激活 Nrf2,进而引起血红素加氧酶-1(heme oxygenase 1, HO-1)等基因的高表达,同时可上调线粒体内超氧化物

歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的活性,从而抑制线粒体呼吸,减少过氧化物的生成,保护线粒体功能^[7]。

笔者前期在基于抗氧化作用的肝保护药物的自制制剂的开发研究中发现基于 Nrf2 的激活作用的药物具有较好的肝保护作用^[8-9],因此本研究旨在 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤模型中,观察 PTE 作为 Nrf2 的天然配体,是否对 APAP 诱导的急性肝损伤具有保护作用,同时探讨相关机制,为开发 APAP 所致药物性肝损伤的治疗药物提供相应的理论与实验依据。

1 材料

1.1 试剂与仪器

APAP(上海源叶生物科技有限公司,批号:YY91059;纯度:99%);IV 型胶原酶(美国 Sigma 公司,批号:V900893);Nrf2(批号:8882)、Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白(Kelch-like ECH-associated protein, Keap1,批号:4678)、Bax(批号:2774)、cytochrome C(批号:4272)、 β -actin(批号:4967)均购于 Cell Signaling Technology;Lamin B 抗体(Abcam,批号:ab8983);细胞核(批号:C500009)、胞质和线粒体蛋白提取试剂盒(批号:C500051)均购于生工生物工程(上海)股份有限公司;TUNEL 试剂盒(Roche,批号:AD09264512);SOD 试剂盒(批号:A001-3)、GSH 试剂盒(批号:A005)、丙二醛试剂盒(malondialdehyde, MDA)(批号:A003-1)均购于南京建成生物研究所;JC-1 试剂盒(批号:C2006)、BCA 试剂盒(批号:P0012S)均购于碧云天生物技术研究所以;谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)测定试剂盒(批号:20024UN19)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)测定试剂盒(批号:55294UQ06)均购自美国雅培公司;总蛋白(total protein, TP)测定试剂盒(批号:92635081)、总胆红素测定试剂盒(批号:92682092)、白蛋白(albumin, Alb)测定试剂盒(批号:92636086)均购于中生北控生物科技股份有限公司,其余试剂均为分析纯;醋酸泼尼松片(天津力生制药有限公司,批号:1412106);PTE(上海恒斐生物科技有限公司,批号:SP9570;纯度:98%)。

IX-70 型荧光显微镜、AU2700 全自动生化分析仪均购自日本 Olympus 公司; LS-50B 型化学发光光度计(日本 Shimadzu 公司); Hema TGL-16R 冷冻高速离心机(珠海黑马医学仪器有限公司)。

1.2 动物

SPF 级♂昆明小鼠 96 只, 体质量 18~22 g, 由甘肃省中医药大学动物实验中心提供, 动物生产许可证号: SCXK(甘)2013-007。实验期间, 小鼠处于控制湿度与光照环境中, 并自由摄取食物与水。

2 方法

2.1 动物分组与处理

将 96 只昆明小鼠随机分为正常对照组、APAP 模型组、阳性对照组[醋酸泼尼松(prednisone, PNS)]、PTE(15 mg·kg⁻¹)组、PTE(30 mg·kg⁻¹)组、PTE(60 mg·kg⁻¹)组, 每组 16 只。适应性饲养 3 d 后, 基于 PTE 的抗氧化活性呈显著的剂量和时间依赖性, 结合笔者前期的预实验结果及相关文献报道^[10], 分别给予 PTE(15, 30, 60 mg·kg⁻¹)灌胃 15 d, 正常对照组与 APAP 模型组分别灌胃等体积的生理盐水, 阳性对照组给予 PNS(7.8 mg·kg⁻¹)。最后一次给药后, 除正常对照组外, 小鼠腹腔注射溶于生理盐水的 APAP(250 mg·kg⁻¹)^[11], 24 h 后, 每组小鼠取 8 只麻醉后用于分离纯化肝细胞; 8 只进行采血、取材后处死。本研究中动物实验遵循的所有程序均符合国家及甘肃省人民医院、甘肃省中医药大学制定的有关实验动物的规则和制度。

2.2 紫檀芪试液的制备

使用前将 PTE 先溶解于 DMSO, 再稀释于 0.9% NaCl 中, 制备成浓度为 3 mg·mL⁻¹ 的母液备用^[12]。

2.3 观察指标

2.3.1 血清生化指标 将采集好的全血于低速自动平衡离心机内离心, 2 000 r·min⁻¹, 15 min。离心后上清采用全自动生化分析仪监测 ALT, AST, TP, Alb 和白球比(Alb/Glb, A/G)。

2.3.2 肝脏组织病理 取肝组织 0.2 g, 4%中性甲醛固定 48 h, 石蜡包埋, 制成 4 μm 切片后, 行常规 HE 染色, 光镜下观察肝脏组织病理变化。由 3 位病理科医师进行双盲读片, 并对观察到的每张病理切片所显示肝损程度进行分级。分级标准^[13]: 0 级, 正常肝组织细胞; 1 级, 肝细胞轻度肿胀, 散发炎性细胞, 个别肝细胞坏死; 2 级, 少于肝小叶 1/3 的局灶或斑块性肝细胞坏死, 聚集性炎性细胞浸润; 3 级, 约占肝小叶 1/3 至 1/2 的广泛肝细胞坏死, 大量炎性细胞浸润; 4 级, 多于肝小叶

1/2 的肝细胞坏死, 广泛炎性细胞浸润。

2.3.3 TUNEL 染色检测肝细胞凋亡 用 TUNEL 试剂盒检测。石蜡切片经二甲苯、梯度酒精脱蜡水化后, 用 0.01 mol·L⁻¹, pH 7.2~7.4 的 PBS 冲洗 5 min×2 次, 过氧离子水封闭 30 min, 蛋白酶 K(20 μg·mL⁻¹)37 °C 消化 30 min, PBS 冲洗 5 min×2 次, 然后滴加 I 液(含末端脱氧核苷酸转移酶)和 II 液(荧光素标记的 dUTP)等体积混合液 100 μL, 37 °C 孵育 1 h, PBS 冲洗 5 min×2 次。以 PBS 替代混合液作为阴性对照, DBA 显色, 苏木素复染, 梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树脂封片。凋亡细胞核可被染成棕黄色, 通过光学显微镜观, 每个切片选取 3 个不同视野察并计数 TUNEL 阳性细胞, 并用 Image J 软件进行半定量分析。

2.3.4 肝组织 MDA、GSH、SOD 检测 取肝脏左前叶组织 0.5 g, 冷生理盐水冲洗, 滤纸吸干, 称重, 冰浴中制成 10%肝匀浆, 3 500 r·min⁻¹ 低温离心 15 min 取上清液。按说明书采用硫代巴比妥酸比色法检测 MDA 含量, TNB 法检测 GSH 水平, 黄嘌呤氧化酶测定 SOD 活性。

2.3.5 肝细胞分离纯化及 JC-1 线粒体膜电位检测 以戊巴比妥钠 10 mL·kg⁻¹ 麻醉小鼠, 固定后剪开皮肤, 暴露肝门静脉, 插入塑料导管(连接装有 20 mL 灌流液注射器), 以 20~40 mL·min⁻¹ 灌注 D-hanks 平衡盐溶液(37 °C 水浴 20 min)10 min, 去除肝内血液, 灌注 5~10 s 后, 结扎下腔静脉远端分支, 在其腹腔段置入另一根塑料导管, 同时结扎胸腔段, 当下腔静脉流出的液体变清时, 开始灌注 37 °C 水浴 20 min 的 0.01% IV 型胶原酶 150 mL, 充分消化后弯钳去除表面包膜, 将肝细胞轻柔分离至 DMEM 培养液中, 细胞悬液经 200 目网筛过滤后用 DMEM 培养液洗涤 3 次, 50 r·min⁻¹, 5 min×3 次低速离心获得纯化的肝细胞, 用于线粒体功能检测。

将纯化的肝细胞计数每毫升 1×10⁶ 个, 加入 0.5 mL JC-1 染色工作液混匀, 细胞培养箱中 37 °C 孵育 20 min 后, 650 r·min⁻¹ 4 °C 离心 3~4 min, 沉淀细胞, 弃上清, 加入 1 mL JC-1 染色缓冲液重悬细胞, 600 r·min⁻¹ 4 °C 离心 3~4 min, 沉淀细胞, 弃上清, 重复 1 次, 再用适量 JC-1 染色缓冲液重悬后, 用荧光显微镜激发波 490 nm, 发射波 590 nm 处检测红绿荧光, 线粒体膜电位降低时, 绿色荧

光增加,结果以红绿荧光比计算。

2.3.6 胞质和线粒体蛋白提取 按照相应试剂盒说明书要求,去除脂肪组织和结缔组织等肝组织 200 mg,于冰上剪碎,再用冷 PBS, pH 7.4 洗涤 3 次。在上述样本中加入 1 mL 胞质提取 Buffer(使用前每 1 mL 胞质提取 Buffer 加入 1 μ L 蛋白酶抑制剂,5 μ L 磷酸酶抑制剂和 1 μ L DTT),置玻璃匀浆器冰上均质 30~50 次,置于冰上冷却。将匀浆液转移至冷的离心管中,最大转速涡旋剧烈振荡 15 s,放置冰上 10~15 min,于 4 $^{\circ}$ C, 3 000 $r\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃沉淀。取上清转移至新冷离心管中,于 4 $^{\circ}$ C, 12 000 $r\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min 以沉淀线粒体,上清转至新管中,为胞浆蛋白,-80 $^{\circ}$ C 冷冻保存备用。取沉淀,加入 0.1 mL 胞质提取 Buffer(使用前处理同上),涡悬震荡洗涤 30 s, 4 $^{\circ}$ C, 13 000 $r\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,去上清。在沉淀中加入 0.1 mL 的线粒体溶解 Buffer(使用前处理同上)。冰上放置 30 min,再涡悬震荡 30 s, 4 $^{\circ}$ C, 13 000 $r\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,得到的上清即为线粒体蛋白,用于 Western blotting 检测。

2.3.7 小鼠肝脏组织胞核蛋白提取 按照试剂盒说明书进行操作。100 mg 肝组织置于离心管, PBS 清洗组织后 500 $r\cdot\text{min}^{-1}$ 、4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,使用移液枪小心弃去上清,加入胞浆提取试剂 I 1 mL,匀浆完全后,剧烈震荡离心管 15 s,冰上孵育 10 min;加入预冷的胞浆提取试剂 II 55 μ L,剧烈震荡离心管 5 s,冰上孵育 1 min,再次剧烈震荡离心管 5 s 后 16 000 $r\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,移液枪吸取上清即为胞浆蛋白提取液,在剩余的沉淀中加入预冷的胞核提取试剂 500 μ L,剧烈震荡使沉淀悬浮;每隔 10 min 震荡 15 s,其余时间均置于冰上孵育,重复操作 4 次后 16 000 $r\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,抽取上清即为胞核蛋白提取液,转移至-80 $^{\circ}$ C 保存。

2.3.8 Western blotting 检测蛋白表达情况 用 BCA 试剂盒测定提取的蛋白浓度,并将蛋白浓度调整为 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,溶解在十二烷基硫酸钠(10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)中,吸取 8 μ L 溶解液制作转膜“三明治”。0.4 A 恒流转膜 1 h,5%的脱脂奶粉封闭 1 h。倒掉封闭液,将膜放置于 5%脱脂奶粉稀释好的一抗[Nrf2、Keap1、Bax、cytochrome C、 β -actin(1:1 000); Lamin B(1:500)]孵育液中,4 $^{\circ}$ C 振摇过夜, TBST 洗膜(每次 5 min,共 3 次)。然后将膜放置于 5%

脱脂奶粉稀释好的羊抗兔二抗孵育液中孵育 1 h, TBST 洗膜(每次 5 min,共 4 次),显色,拍照。

2.4 统计学分析

用 SPSS 21.0 进行数据统计,所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,定量数据的组间差异分析采用 ANOVA 及 Newman-Student 多重比较 t 检验,肝组织病理分级数据采用 Mann-Whitney U 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 PTE 对 APAP 诱导急性肝损伤小鼠的血清 ALT、AST、TP、Alb、A/G 的影响

与正常组对照组相比,APAP 模型组血清 ALT、AST 水平显著升高($P<0.01$),同时血清 TP、Alb、A/G 值显著降低($P<0.01$);与 APAP 模型组相比,阳性对照组与 PTE 组(15, 30, 60 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)的血清 ALT、AST 水平显著降低($P<0.01$),血清 TP、Alb、A/G 值显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表 1。

3.2 PTE 对 APAP 诱导急性肝损伤小鼠肝脏病理组织学的影响

正常对照组小鼠肝组织细胞正常,肝窦清晰,肝索排列整齐,细胞核染色均匀,大小正常,肝脏分级为 0 级;APAP 模型组多于肝小叶 1/2 的肝细胞坏死,广泛炎症浸润,多数分级为 4 级;PTE(60 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组大多分级为 0 级和 1 级,肝细胞有轻度的肿胀,个别肝细胞坏死;阳性对照组肝细胞轻度肿胀,有个别肝细胞坏死,病理分级主要是 1 级,结果见图 1、表 2。

3.3 PTE 对 APAP 诱导肝细胞凋亡的影响

TUNEL 染色结果表明正常肝细胞组无明显凋亡,APAP 模型组肝细胞凋亡明显,核褐变明显增加,阳性对照组和 PTE 组与 APAP 模型组相比,凋亡细胞显著减少($P<0.01$)。结果见图 2。

3.4 PTE 对 APAP 诱导急性肝损伤小鼠细胞凋亡相关因子表达的影响

与正常对照组相比,APAP 模型组细胞质中的 Bax 表达显著降低($P<0.01$),而对应的线粒体中 Bax 表达显著增加($P<0.01$),与 APAP 模型组比较,阳性对照组和不同浓度的 PTE 组细胞质中 Bax 表达显著增加($P<0.01$),线粒体中 Bax 表达显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。同时,与正常对照组相比,APAP 模型组细胞质中的 cytochrome C 表达显著增加($P<0.01$),而对应的线粒体中 cytochrome C 表达

表 1 PTE 对 APAP 诱导急性肝损伤小鼠的血清 ALT, AST, TP, Alb 及 A/G 的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Tab. 1 Effects of PTE on serum ALT, AST, TP, Alb, A/G in APAP-induced liver injury model mice($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	AST/U·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	TP/g·L ⁻¹	Alb/g·L ⁻¹	A/G
正常对照组	98.32±3.20	38.12±2.03	63.35±2.01	42.01±0.93	1.81±0.11
APAP 模型组	565.73±23.31 ¹⁾	99.07±3.08 ¹⁾	47.14±3.03 ¹⁾	26.32±2.01 ¹⁾	1.04±0.09 ¹⁾
PTE(15 mg·kg ⁻¹)组	425.12±7.89 ²⁾	50.34±4.03 ²⁾	51.27±1.89 ²⁾	30.78±1.37 ²⁾	1.25±0.21 ³⁾
PTE(30 mg·kg ⁻¹)组	378.36±5.03 ²⁾	47.56±2.07 ²⁾	56.66±2.05 ²⁾	34.05±1.51 ²⁾	1.36±0.08 ²⁾
PTE(60 mg·kg ⁻¹)组	213.52±7.12 ²⁾	40.79±5.13 ²⁾	60.13±1.08 ²⁾	38.12±2.71 ²⁾	1.51±0.17 ²⁾
阳性对照组	207.37±3.07 ²⁾	34.15±1.08 ²⁾	59.37±2.13 ²⁾	40.01±2.08 ²⁾	1.58±0.33 ²⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与 APAP 模型组比较, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with APAP model group, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.05$.

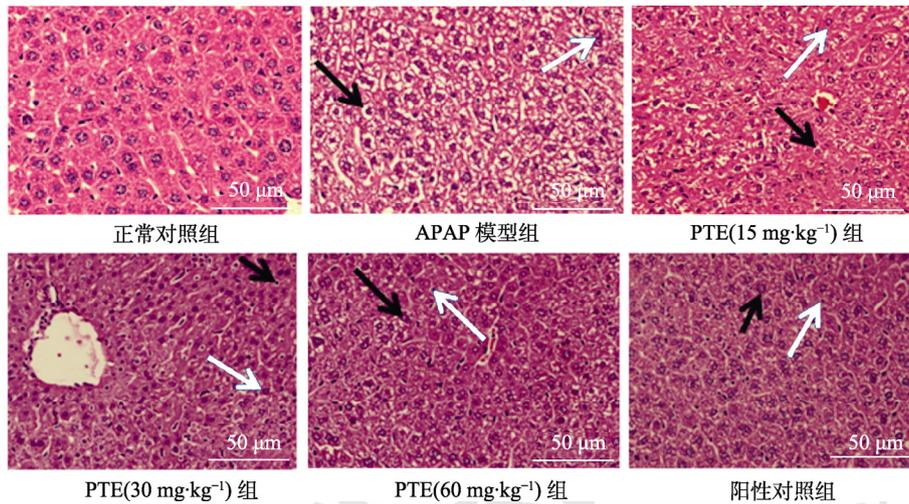


图 1 PTE 对 APAP 诱导急性肝损伤小鼠的肝脏病理组织学影响(HE, 400×)

黑色箭头为坏死肝细胞, 白色箭头为正常肝细胞。

Fig. 1 Effect of PTE on the liver histopathology on APAP-induced acute liver injury(HE, 400×)

Black arrow points to necrotic hepatocytes, white arrow points to normal hepatocytes.

表 2 PTE 对 APAP 诱导急性肝损伤小鼠肝脏病理损伤评分的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Tab. 2 Effect of PTE on liver histopathological scores of APAP-induced acute liver injury mice($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	肝脏损伤的程度(等级)/n				
	0	I	II	III	IV
正常对照组	8	0	0	0	0
APAP 模型组	0	0	0	1	7
PTE(15 mg·kg ⁻¹)组	1	4	2	1	0
PTE(30 mg·kg ⁻¹)组	2	4	1	1	0
PTE(60 mg·kg ⁻¹)组	2	5	1	0	0
阳性对照组	3	4	1	0	0

显著降低($P<0.01$), 与 APAP 模型组比较, 阳性对照组和不同浓度的 PTE 组细胞质中 cytochrome C 表达显著降低($P<0.01$), 线粒体中 cytochrome C 表达显著增加($P<0.01$)。结果见图 3。

3.5 PTE 对 APAP 诱导的急性肝损伤小鼠线粒体膜电位的影响

采用 JC-1 直接检测了肝细胞中线粒体膜位, 结果见图 4, 与正常对照组相比, APAP 模型组线

粒体膜电位显著降低($P<0.01$), 与 APAP 模型组比较, 阳性对照组与不同浓度的 PTE 组线粒体膜电位显著升高($P<0.01$)。

3.6 PTE 对 APAP 诱导急性肝损伤小鼠肝脏组织 MDA、SOD、GSH 的影响

与正常对照组相比, APAP 模型组小鼠肝组织的 MDA 明显增高($P<0.01$), 同时 GSH、SOD 明显降低($P<0.01$); 与 APAP 模型组相比, 阳性对照组与不同浓度 PTE 组小鼠 MDA 降低($P<0.01$), GSH、SOD 升高($P<0.01$), 该结果提示 PTE 可一定程度提高受损肝脏的抗氧化能力, 结果见表 3。

3.7 PTE 对 APAP 诱导的急性肝损伤小鼠肝组织 Keap1/Nrf2 表达的影响

与正常对照组相比, APAP 诱导肝组织总的 Nrf2 表达显著降低($P<0.01$), Keap1 表达显著增加($P<0.01$); 与 APAP 模型组比较, 阳性对照组及不同浓度的 PTE 组 Nrf2 表达显著增加($P<0.01$), Keap1 表达显著降低($P<0.01$)。为了进一步明确

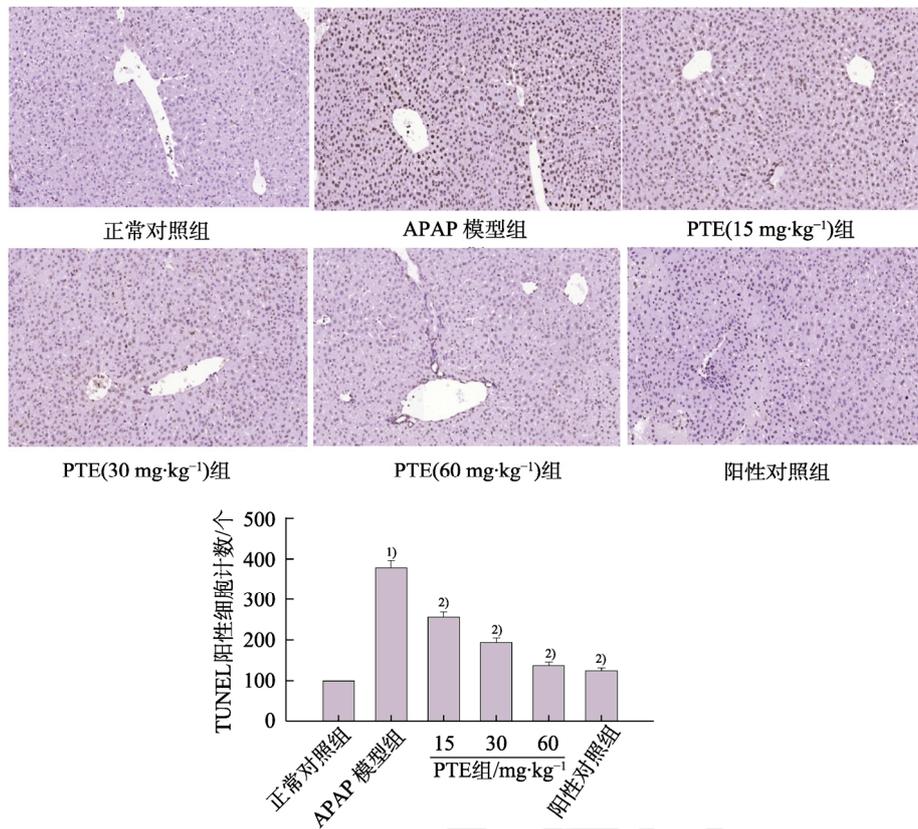


图 2 PTE 对 APAP 诱导的急性肝损伤小鼠肝细胞凋亡的影响(200×)

与正常对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与 APAP 模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 2 Effects of PTE on hepatocyte apoptosis in APAP-induced acute liver injury mice(200×)

Compared with normal control group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with APAP model group, ²⁾ $P < 0.01$ 。

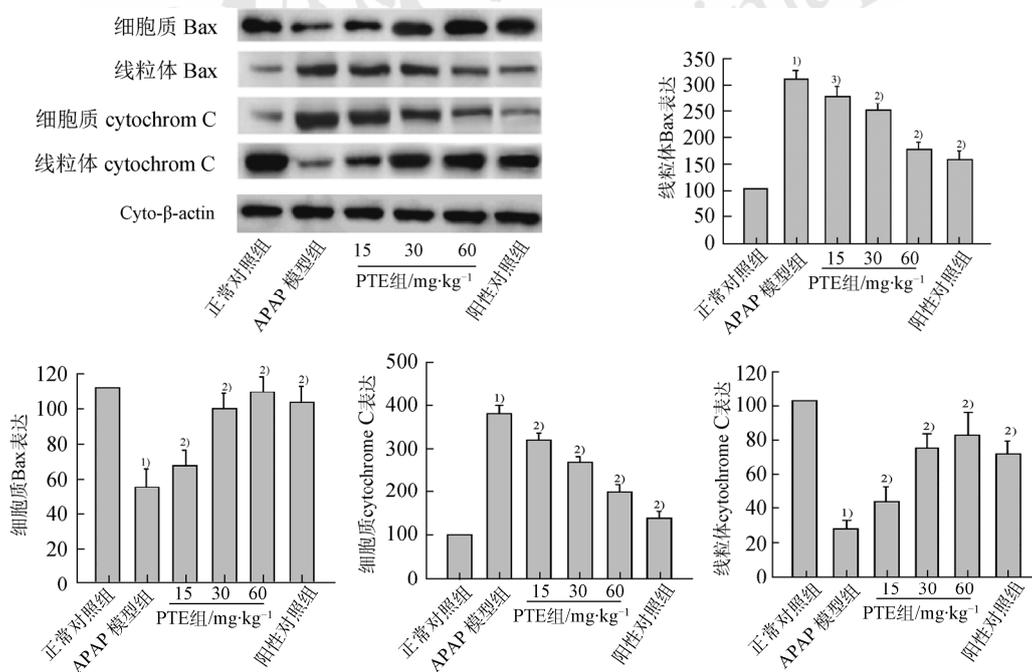


图 3 PTE 对 APAP 诱导的急性肝损伤小鼠线粒体途径相关凋亡因子的影响

与正常对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与 APAP 模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 3 Effect of PTE on the expression of mitochondrial-induced apoptosis factors in APAP-induced acute liver injury mice

Compared with normal control group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with APAP model group, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.05$ 。

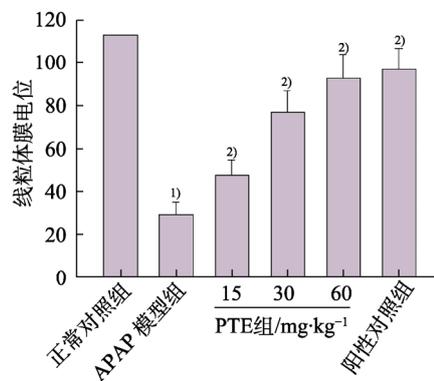
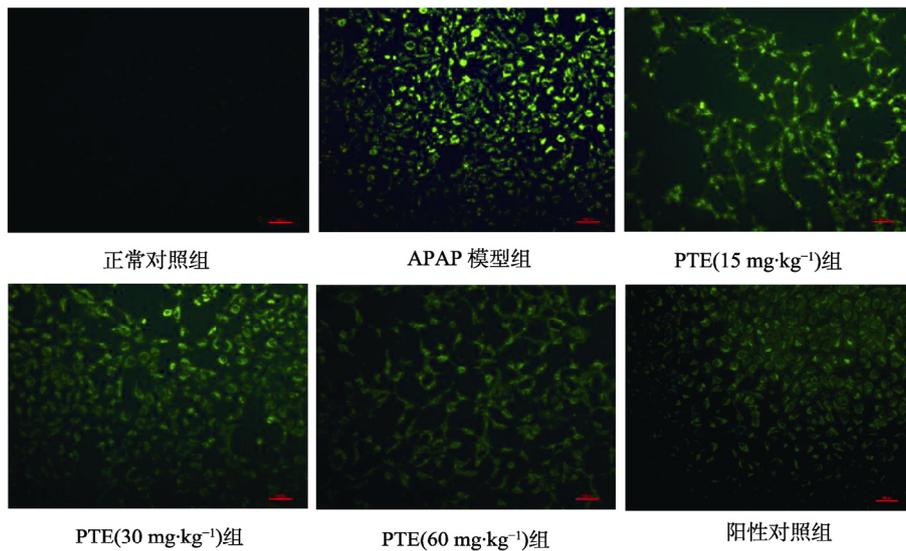


图 4 PTE 对 APAP 诱导的急性肝损伤小鼠线粒体膜电位的影响
与正常对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与 APAP 模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 4 Effect of PTE on mitochondrial membrane potential in APAP-induced acute liver injury mice
Compared with normal control group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with APAP model group, ²⁾ $P < 0.01$.

表 3 PTE 对 APAP 诱导肝损伤小鼠肝脏组织 MDA、SOD、GSH 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Tab. 3 Effects of PTE on MDA, SOD, GSH of liver tissues in APAP-induced acute liver injury mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	SOD/ kU·g ⁻¹ Pro	GSH/ mg·g ⁻¹ Pro	MDA/ μmol·g ⁻¹ Pro
正常对照组	101.12±3.21	40.12±3.01	0.87±0.03
APAP 模型组	23.11±2.77 ¹⁾	10.72±2.14 ¹⁾	2.21±0.21 ¹⁾
PTE(15 mg·kg ⁻¹)组	37.51±3.12 ²⁾	23.15±4.12 ²⁾	1.98±0.06 ²⁾
PTE(30 mg·kg ⁻¹)组	45.13±2.17 ²⁾	30.23±1.79 ²⁾	1.78±0.08 ²⁾
PTE(60 mg·kg ⁻¹)组	59.23±1.28 ²⁾	36.65±3.66 ²⁾	1.32±0.06 ²⁾
阳性对照组	62.14±3.56 ²⁾	39.17±5.07 ²⁾	1.15±0.11 ²⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与 APAP 模型组比较, ²⁾ $P < 0.01$ 。
Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with APAP model group, ²⁾ $P < 0.01$.

PTE 对 Nrf2 的激活作用, 直接检测了细胞质和细胞核的 Nrf2 表达, 结果显示与正常对照组相比, APAP 模型组细胞核 Nrf2 表达降低($P < 0.01$), 与

APAP 模型组比较, 不同浓度 PTE 组细胞核 Nrf2 表达显著升高($P < 0.01$), 提示 PTE 可促进 Nrf2 的核转录活化。结果见图 5。

4 讨论

本研究发现, PTE 对 APAP 诱导的急性肝损伤具有保护作用, 其机制与 PTE 激活 Nrf2, 抑制氧化应激, 保护线粒体功能有关。

在本研究中, 笔者在体外 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤模型中, 发现 PTE 显著降低 APAP 引起的血清 ALT、AST 水平的升高, 增加血清 TP, Alb, A/G 值, 病理分级结果与生化指标相一致。ALT、AST 主要存在于肝细胞中, 当肝细胞受损时使肝细胞膜通透性增加, 细胞内酶大量释放入血, 使血浆 ALT、AST 升高, 以上结果表明 PTE 对 APAP 引起的急性肝损伤具有一定的保护作用。

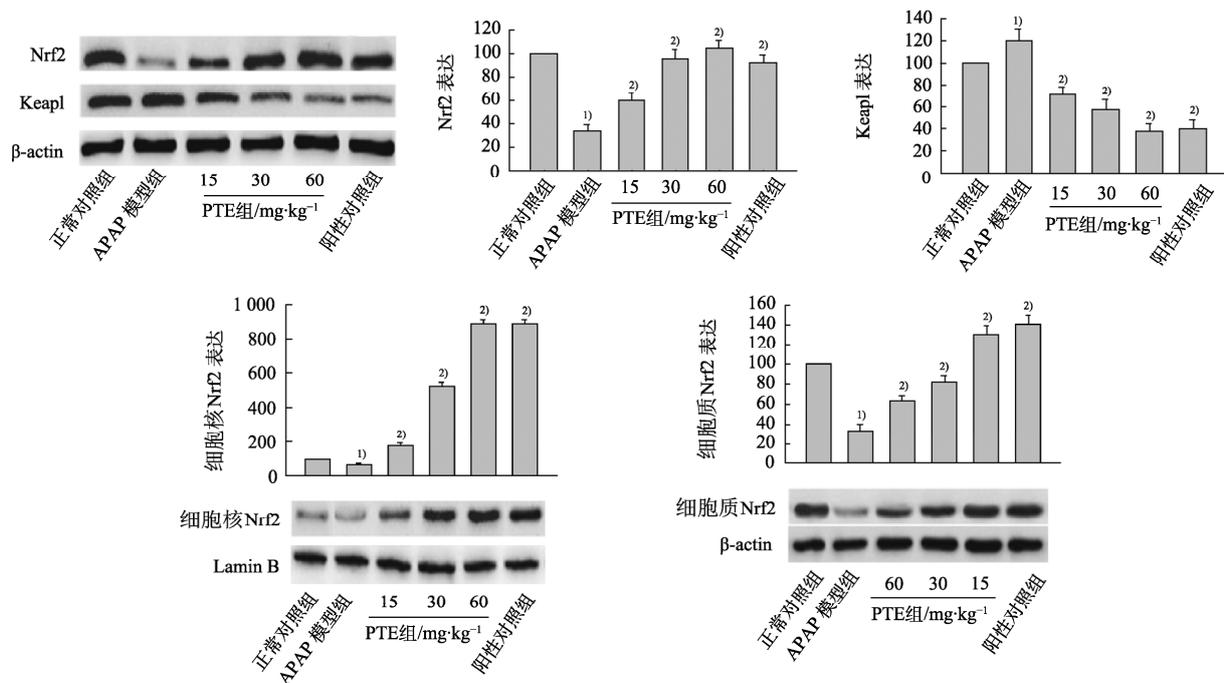


图 5 PTE 对 APAP 诱导急性肝损伤小鼠肝组织 Nrf2 和 Keap1 表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与 APAP 模型组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 5 Effect of PTE on Nrf2 and Keap1 in APAP-induced acute liver injury mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with APAP model group, ²⁾ $P<0.01$.

Bcl-2 家族是控制线粒体相关的凋亡因子释放的主要调节因子, Bax 是 Bcl-2 家族中已知的促凋亡因子, 该因子调控线粒体外膜通透性, Bax 正常情况下存在于胞质中, 当线粒体的膜电位下降, 线粒体膜通透性增加时, 在促凋亡信号的作用下, Bax 重新定位于线粒体, Moon 等^[14]研究证实 PTE 通过激活 Bax 和过表达诱导乳腺癌细胞凋亡。以往研究显示 APAP 主要是通过触发线粒体途径诱导肝细胞凋亡, 因此笔者进一步检测了线粒体介导细胞凋亡途径的相关因子的表达。结果显示, 与正常组对照相比, APAP 模型组细胞质中的 Bax 表达显著降低, 而对应的线粒体中 Bax 表达显著增加。因此该部分结果提示不同浓度的 PTE 可以显著抑制 APAP 诱导的 Bax 线粒体转位。cytochrome C 是细胞凋亡过程中释放的线粒体源蛋白, 释放到细胞质中, 导致细胞凋亡, 本研究证实了这一结果。为了进一步验证 PTE 是否通过线粒体途径抑制 APAP 诱导的肝细胞凋亡, 笔者在分离纯化的肝细胞中直接检测了线粒体膜电位。结果显示, 与正常对照组相比, APAP 模型组线粒体膜电位显著降低, 不同浓度的 PTE 可以显著抑制 APAP 对线粒体膜电位的作用。Zhang 等^[15]研究了 PTE 在减轻早期断奶仔猪肝损伤、线粒体功能障碍的作

用, 结果显示 PTE 通过抑制线粒体功能障碍来减轻断奶仔猪的肝损伤。本研究结果初步证实 PTE 可能是基于线粒体的保护作用, 抑制 APAP 诱导的肝细胞的凋亡。

氧化应激是 APAP 诱导肝损伤的关键起始环节, 与线粒体功能损伤相互作用形成负反馈加速 APAP 所致肝损伤。SOD、GSH 是体内的抗氧化酶; MDA 是脂质过氧化反应的终产物, 其含量间接反映了组织的过氧化损伤程度。本研究结果显示 PTE 可以显著改善 APAP 诱导的 SOD、GSH 抗氧化酶的降低, 同时减少 MDA 的生成, 初步提示 PTE 可能通过抑制氧化应激发挥对 APAP 诱导的肝损伤的保护作用。鉴于这些氧化酶指标只是间接反映了机体的氧化抗氧化的平衡被打破, 因此笔者进一步探讨了 PTE 具体的抗氧化机制。

以往研究认为 PTE 是 Nrf2 的天然配体, 通过激活 Nrf2 发挥抗氧化作用。Nrf2 是含有 6 个高度保守的结构域 Neh 的氧化应激转录因子, 在生理条件下, Nrf2 与 Keap1 相结合位于细胞质内^[16], 当受到 ROS 或是其他因素刺激, Keap1 的半胱氨酸残基被稀释并致 Keap1 发生构象改变, 导致 Nrf2 磷酸化, Nrf2 与 Keap1 发生解离, Nrf2 转位到细胞核内, 激活抗氧化反应元件, 从而启动下游基

因的表达发挥抗氧化的作用。Nrf2 激活后可调节肝脏中一系列解毒和抗氧化防御基因的表达^[17], 缺乏 Nrf2 的动物极易受到 APAP 等毒物刺激而引起氧化应激进而引起线粒体功能损伤, Liu 等^[18] 研究发现与野生型小鼠相比, Nrf2 基因敲除小鼠表现出更大的肝损伤易感性, 另有研究报道甘草酮 A 通过上调 Nrf2 抗氧化途径, 可以抑制氧化损伤、线粒体功能障碍和细胞凋亡, 对 APAP 引起的肝毒性具有保护作用^[19]。本研究结果与以往相关研究结果一致。以往研究报道 Nrf2 激活后, 可能通过诱导醌氧化还原酶 1 表达、锰超氧化物歧化酶或 HO-1 的表达来发挥抗氧化作用, 而关于 PTE 激活 Nrf2 后, 下游的靶基因究竟是哪一个, 尚需要进一步实验证实。

本研究初步证实了基于 Nrf2 的激活作用, PTE 对 APAP 诱导的药物性肝损伤具有一定的保护作用。在动物实验中笔者未能充分证实 PTE 对氧化应激、Nrf2 与线粒体凋亡途径三者之间明确的上下游调控关系, 尚需在细胞分子水平中通过互作实验进一步验证。同时笔者未直接检测线粒体来源的活性氧的水平变化情况及检测细胞凋亡途径最终激活的 caspase3 的表达水平变化, 是本研究的不足之处。目前动物实验研究表明 PTE 具有良好的生物利用度及安全性, 因此本研究为 PTE 在药物性肝损伤中的应用提供了一定的依据, 同时基于 PTE 为 Nrf2 的天然配体, 本研究亦为 Nrf2 是否为药物性肝损伤的关键干预靶点提供了一定的理论与实验依据。

REFERENCES

[1] 陈熠媛, 陈硕崑, 张谢, 等. 对乙酰氨基酚肝毒性研究进展[J]. 浙江医学, 2019, 41(8): 852-853, 858.

[2] LI Q X, ZHANG Y B. Molecular mechanism and application of acetaminophen-induced hepatic failure through hepatic mitochondrial damage[J]. Prog Pharm Sci(药学进展), 2019, 43(10): 786-792.

[3] FAN X Y, WANG L D, HUANG J B, et al. Pterostilbene reduces acetaminophen-induced liver injury by activating the Nrf2 antioxidative defense system via the AMPK/Akt/GSK3 β pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 49(5): 1943-1958.

[4] CHIOU Y S, TSAI M L, NAGABHUSHANAM K, et al. Pterostilbene is more potent than resveratrol in preventing azoxymethane(AOM)-induced colon tumorigenesis via activation of the NF-E2-related factor 2(Nrf2)-mediated antioxidant signaling pathway[J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(6): 2725-2733.

[5] WANG P, SANG S M. Metabolism and pharmacokinetics of resveratrol and pterostilbene[J]. Biofactors, 2018, 44(1):

16-25.

[6] ELANGO B, DORNADULA S, PAULMURUGAN R, et al. Pterostilbene ameliorates streptozotocin-induced diabetes through enhancing antioxidant signaling pathways mediated by Nrf2[J]. Chem Res Toxicol, 2016, 29(1): 47-57.

[7] YANG Y, FAN C X, WANG B D, et al. Pterostilbene attenuates high glucose-induced oxidative injury in hippocampal neuronal cells by activating nuclear factor erythroid 2-related factor 2[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863(4): 827-837.

[8] WU S J, SA R N, GU Z R, et al. The hepatoprotective effect of *Aesculus hippocastanum* seed extract against concanavalin A-induced acute liver injury in mice via inhibition of ROS and JNK pathway[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2018, 34(3): 412-418.

[9] YU J, DUAN B W, ZHAO P, et al. Protective effects and the mechanism of *Dendrobium officinale* on concanavalin a-induced acute liver injury in mice[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床), 2019, 35(1): 82-87.

[10] EL-SAYED EL-SM, MANSOUR A M, NADY M E. Protective effects of pterostilbene against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2015, 29(1): 35-42.

[11] UCHIDA N S, SILVA-FILHO S E, AGUIAR R P, et al. Protective effect of *Cymbopogon citratus* essential oil in experimental model of acetaminophen-induced liver injury[J]. Am J Chin Med, 2017, 45(3): 515-532.

[12] YU Z X, WANG S H, ZHANG X Y, et al. Pterostilbene protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via suppressing oxidative/nitritative stress and inflammatory response[J]. Int Immunopharmacol, 2017(43): 7-15.

[13] WANG F, XUE Y, YANG J Y, et al. Hepatoprotective effect of apple polyphenols against concanavalin A-induced immunological liver injury in mice[J]. Chem Biol Interact, 2016(258): 159-165.

[14] MOON D, MCCORMACK D, MCDONALD D, et al. Pterostilbene induces mitochondrially derived apoptosis in breast cancer cells *in vitro*[J]. J Surg Res, 2013, 180(2): 208-215.

[15] ZHANG H, CHEN Y N, LI Y, et al. Protective effects of pterostilbene against hepatic damage, redox imbalance, mitochondrial dysfunction, and endoplasmic reticulum stress in weanling piglets[J]. J Anim Sci, 2020, 98(10): skaa328. Doi: 10.1093/jas/skaa.328.

[16] BAI Q Y. Role of Nrf2 signaling pathway in liver regeneration and research progress of related drugs[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2019, 35(1): 20-23.

[17] SHIN S M, YANG J H, KI S H. Role of the Nrf2-ARE pathway in liver diseases[J]. Oxid Med Cell Longev, 2013(2013): 763257. Doi: 10.1155/2013/763257.

[18] LIU F, ICHIHARA S, VALENTINE W M, et al. Increased susceptibility of Nrf2-null mice to 1-bromopropane-induced hepatotoxicity[J]. Toxicol Sci, 2010, 115(2): 596-606.

[19] LYU H, XIAO Q F, ZHOU J F, et al. Licochalcone A . upregulates Nrf2 antioxidant pathway and thereby alleviates acetaminophen-induced hepatotoxicity[J]. Front Pharmacol, 2018(9): 147. Doi: 10.3389/fphar.2018.00147.

收稿日期: 2020-06-10
(本文责编: 陈怡心)