

· 基础研究 ·

黄芪甲苷对急性肝衰竭小鼠抗氧化、
抗凋亡机制探讨刘 丽¹ 周 宇² 李双杰³

摘要 **目的** 研究黄芪甲苷 (AS-IV) 对急性肝衰竭小鼠转录因子 NF-E2 相关因子 2 (Nrf2) / 血红素氧化酶 -1 (HO-1) 和 B 淋巴细胞瘤 -2 基因 (Bcl-2) / Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 表达的影响, 并探讨其抗氧化、抗凋亡的作用机制。**方法** 将 50 只 C57BL6 雄性小鼠随机分为正常组, 模型组, 低、中、高剂量 AS-IV 组, 每组 10 只。低、中、高剂量 AS-IV 组分别给予 50、150、500 mg / (kg · d) AS-IV 预处理 3 天, 正常组和模型组仅给予助溶剂预处理, 然后正常组腹腔注射生理盐水, 余 4 组分别给予 D-GalN/LPS 腹腔注射建立急性肝衰竭小鼠模型。留取肝组织病理标本, 采用 Western Blot 和 Real-Time PCR 技术检测各组 Nrf2、HO-1、Bcl-2、Bax、半胱氨天冬蛋白酶 -3 (Caspase-3) 蛋白及 mRNA 的表达水平。**结果** 与正常组比较, 模型组小鼠肝组织 Nrf2、HO-1、Bcl-2/Bax 蛋白及 mRNA 表达降低 ($P < 0.01$), Caspase-3 蛋白及 mRNA 表达增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 低剂量 AS-IV 组小鼠肝组织 Nrf2 蛋白及 HO-1、Bcl-2/Bax 蛋白及 mRNA 表达增加 ($P < 0.01$), Caspase-3 蛋白及 mRNA 表达减低 ($P < 0.01$); 中剂量 AS-IV 组 Nrf2 mRNA 及 HO-1、Bcl-2/Bax 蛋白及 mRNA 表达增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), Caspase-3 蛋白及 mRNA 表达减低 ($P < 0.01$); 高剂量 AS-IV 组 Nrf2、HO-1、Bcl-2/Bax 蛋白及 mRNA 表达增高 ($P < 0.01$), Caspase-3 蛋白及 mRNA 表达下降 ($P < 0.01$)。与低剂量 AS-IV 组比较, 中、高剂量 AS-IV 组 HO-1、Bcl-2/Bax 蛋白及 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 高剂量 AS-IV 组 Nrf2 蛋白及 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), Caspase-3 蛋白及 mRNA 表达下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与中剂量 AS-IV 组比较, 高剂量 AS-IV 组 HO-1 蛋白及 mRNA、Bcl-2/Bax 蛋白、Nrf2 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), Caspase-3 蛋白及 mRNA 表达下降 ($P < 0.01$)。**结论** 高剂量 AS-IV 对急性肝衰竭小鼠有保护作用, 其机制可能与通过 Nrf2 增强 HO-1 的表达, 减轻氧化应激所致急性肝损伤, 以及上调 Bcl-2 的表达, 降低 Bax、Caspase-3 水平, 从而抑制肝细胞凋亡有关。

关键词 急性肝衰竭; 黄芪甲苷; 小鼠; 抗氧化; 抗凋亡; 中药

Exploration on the Mechanism of Anti-Oxidation and Anti-Apoptosis of Astragaloside IV in Acute Liver Failure Mice LIU Li¹, ZHOU Yu², and LI Shuang-jie³ ¹ Department of Pediatrics, Zhuji People's Hospital of Zhejiang Province, Zhejiang (311800); ² ICU, Zhuji People's Hospital of Zhejiang Province, Zhejiang (311800); ³ Department of Hepatology, Children's Hospital of Hunan Province, Changsha (410007)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Astragaloside IV (AS-IV) on the expression of NF-E2-related factor 2 (Nrf2) / heme oxygenase-1 (HO) and Bcl-2/Bax in acute liver failure (ALF) mice, and to explore its mechanism of anti-oxidative and anti-apoptotic. **Methods** Fifty C57BL6 male mice were randomly divided into normal control group, model group, low dose AS-IV group, medium dose AS-IV group, and high dose AS-IV group, 10 mice in each group. Different dosage (50, 150, 500 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) of AS-IV was administrated by gavage to the three intervention groups for 3 days, at the same time, cosolvent was given to the normal control

基金项目: 浙江省卫生健康科技计划青年创新人才项目 (No. 2022RC283); 诸暨市医药卫生科技计划项目 (No. 2020YW045)

作者单位: 1. 诸暨市人民医院儿科 (浙江 311800); 2. 诸暨市人民医院重症监护室 (浙江 311800); 3. 湖南省儿童医院肝病中心 (长沙 410007)

通讯作者: 李双杰, Tel: 0731-85356229, E-mail: 2273858951@qq.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20230509.047

group and the model group. Then the normal control group was given normal saline by intraperitoneal injection, while the other 4 groups were given D-GalN and LPS by intraperitoneal injection to establish mice models of ALF. Liver histopathological specimens were retained, and the Nrf2, HO-1, Bcl-2, Bax, Caspase-3 protein and mRNA expression in liver tissues were detected by Western Blot and Real-Time PCR. **Results** Compared with the normal group, the expression of Nrf2, HO-1, and Bcl-2/Bax protein and mRNA in the liver tissue decreased ($P<0.01$), Caspase-3 protein and mRNA increased ($P<0.01$). Compared with the model group, the expression of Nrf2 protein, HO-1 and Bcl-2/Bax protein and mRNA increased ($P<0.01$), Caspase-3 protein and mRNA decreased ($P<0.01$) in the low dose AS-IV group. The expression of Nrf2 mRNA, HO-1, and Bcl-2/Bax protein and mRNA increased ($P<0.05$, $P<0.01$), Caspase-3 protein and mRNA decreased in the medium dose AS-IV group ($P<0.01$). The expression of Nrf2, HO-1, Bcl-2/Bax protein and mRNA increased ($P<0.01$), Caspase-3 protein and mRNA decreased in the high dose AS-IV group ($P<0.01$). Compared with the low dose AS-IV group, the expression of HO-1 and Bcl-2/Bax protein and mRNA increased ($P<0.05$, $P<0.01$) in the medium and high dose AS-IV group, the expression of Nrf2 protein and mRNA increase ($P<0.05$, $P<0.01$), Caspase-3 protein and mRNA decreased ($P<0.05$, $P<0.01$) in the high dose AS-IV group. Compared with the medium dose AS-IV group, the expression of HO-1 protein and mRNA, Bcl-2/Bax protein, Nrf2 mRNA increased ($P<0.05$, $P<0.01$), Caspase-3 protein and mRNA decreased ($P<0.01$) in the high dose AS-IV group. **Conclusion** Early administration of high dose AS-IV can protect mice against acute liver failure induced by D-GalN/LPS, its mechanism may be related to the enhanced expression of antioxidant protein HO-1 by Nrf2, which can alleviate the acute liver injury induced by oxidative stress, and the up-regulation of the expression of anti apoptosis protein Bcl-2, but down-regulation of Bax, Caspase-3, inhibiting hepatic apoptosis.

KEYWORDS acute liver failure; Astragaloside-IV; mice; anti-oxidation; anti-apoptosis; Chinese herbal medicine

急性肝衰竭 (acute liver failure, ALF) 病死率极高, 其发病机制复杂, 至今尚无有效药物治疗。越来越多的证据表明氧化应激、细胞凋亡是急性肝损伤的重要机制, 转录因子 NF-E2 相关因子 2 (NF-E2-related factor 2, Nrf2) 是调节抗氧化应激反应的重要转录因子, 可能是 ALF 治疗的重要靶点^[1, 2]。黄芪甲苷 (Astragaloside IV, AS-IV) 是传统中药黄芪的主要活性成分, 其药理作用广泛, 研究发现 AS-IV 对 ALF 小鼠具有较强的抗氧化、抗凋亡保护作用^[3], 但其对氧化应激关键调节因子 Nrf2、凋亡相关基因 B 淋巴细胞瘤-2 / Bcl-2 相关 X (B-cell lymphoma-2/Bcl-2 associated X, Bcl-2/Bax) 的表达是否有调控作用, 目前国内外鲜有报道。本研究选择 AS-IV 作为研究药物, 采用经典的 D-氨基半乳糖 / 内毒素 (D-galactosamine/Lipopolysaccharide, D-GalN/LPS) 诱导小鼠 ALF 模型, 观察 AS-IV 对 Nrf2/HO-1) 和 Bcl-2/Bax 表达的影响, 探索 AS-IV 相关药理学机制。

材料与方法

1 动物 C57BL6 小鼠 50 只, 雄性, SPF 级, 6~8 周龄, 体重 (20 ± 2) g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 许可证号: SCXK (湘) 2011-

0003。饲养及实验场所由湖南省儿童医院儿科医学研究所提供, 实验动物使用许可证号: SYXK (湘) 2020-0004。屏障环境, 分笼饲养, 室温 ($20 \sim 25$) °C, 通风, 相对湿度 50%~60%, 每隔 12 h 开灯照明, 自由进食水。本实验获诸暨市人民医院医学伦理委员会批准 (No.[2021] 医伦第 (0805) 号), 实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

2 药物 AS-IV (成都 King-tiger 有限公司, 纯度 >98%, 批号: 84687-43-4) 为纯白色干粉剂, 不溶于水, 用助溶剂 1% 羧甲基纤维素钠 (国药集团化学试剂有限公司) 制成均匀悬液, 浓度分别为 1%、3%、10%; D-氨基半乳糖胺、脂多糖 (美国 Sigma 公司)。

3 主要试剂及仪器 主要试剂: Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (批号: P0006)、超敏化学发光显色试剂盒 (批号: P0018M) 均购自江苏碧云天生物科技公司; 封闭蛋白干粉 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号: AR0187); 彩色预染蛋白 marker (批号: 26616)、反转录试剂盒 (批号: K1622) 均购自 Fermentas 公司; 羊抗鼠二抗 (批号: 115-625-146)、羊抗兔二抗 (批号: 111-625-144) 均购自 Jackson 公司; 兔抗人 Nrf2 单克隆抗体 (批号: YT3189)、兔抗人 Bcl-2 单克隆抗体 (批号: YT0470)、兔抗

人 Bax 多克隆抗体 (批号: YT0459)、兔抗人半胱氨天冬蛋白酶 -3 (cysteiny aspartatespecific proteinase-3, Caspase-3) 多克隆抗体 (批号: YT0656) 均购自 Immunoway 公司; 兔抗人 HO-1 多克隆抗体 (Epitomics 公司, 批号: 1922-1); 鼠抗人 β -actin 单克隆抗体 (批号: YB-19736)、蛋白印迹膜再生液 (批号: YB0163) 均购自 ABZOOM 公司; TRIZOL 试剂 (Invitrogen 公司, 批号: 15596018); SYBR Green qPCR Mix (TOYOBO 公司, 批号: QPK-201)。主要仪器: 多管架自动平衡离心机 (湖南湘仪公司, 型号: TDZ5-WS); 全自动生化分析仪 (德国西门子, 型号: ADVIA2400); -75 °C 超低温冰箱 (Haier, 型号: DW-86L578J); 超声波破碎仪 (美国 Qsonica 公司, 型号: Q125); 电泳仪 (型号: DYY-6C)、迷你双垂直电泳仪 (型号: DYCZ-24DN, 小号)、迷你转印电泳仪 (槽) (型号: DYCP-40D)、水平摇床 (型号: WD-9405B) 均购自北京六一仪器厂); 恒温摇床 (金坛江南仪器厂, 型号: THZ-82A); 纯水仪 (Heal Force 公司, 型号: EASY15); 医用 X 射线光片 (Koda 公司, 型号: BX 型); 紫外可见分光光度计 (上海 Spectrum 公司, 型号: SP-752); 台式冷冻高速离心机 (型号: EXPERT 16K-R)、低速离心机 (型号: GENIUS 5K)、低温台式离心机 (型号: 16K-R) 均购自长沙鑫奥公司; 酶标仪 (Thermo 公司, 型号: Multiskan MK3); 96 孔细胞培养板 (Costar 公司, 型号: 3599); 紫外/可见光分光光度计 (美国 Perkin Elmer 公司, 型号: Costar); 精密分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司, 型号: AE240); 医用净化工作台 (吴江市净化设备总厂, 型号: YJ-875A); 0.2 mL PCR 管 (型号: PCR-02-C)、八连管 (型号: PCR-0208-pC) 均购自美国 AXYGEM 公司; 荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司, 型号: CFX96)。

4 动物分组、造模及干预方法 将 50 只小鼠适应性喂养 1 周后按随机数字表法分为正常组, 模型组, 低、中、高剂量 AS-IV 组, 每组 10 只。药物组分别给予 1%、3%、10% 不同浓度 AS-IV 0.1 mL 灌胃 [剂量分别为 50、150、500 mg/(kg·d), 分别相当于成人临床用量的 1、3、10 倍], 正常组及模型组则给予等量助溶剂 (1% 羧甲基纤维素钠), 连续灌胃 3 天, 末次给药后 2 h, 除正常组予等量生理盐水腹腔注射外, 其余各组均采用 D-GalN 500 mg/kg+LPS 10 μ g/kg 0.1 mL 联合腹腔注射造模^[3, 4]。造模过程中, 共有 2 只小鼠 (均为模型组小鼠) 因昏迷、抽搐

死亡, 造模成功率 95%。

5 检测指标及方法

5.1 一般情况 观察小鼠活动、摄食饮水、精神状态及竖毛等情况。

5.2 标本采集 于造模后 6 h, 摘眼球取血 1 mL, 3 000 r/min 离心 10 min, 取血清标本; 取血后立即脱臼处死全部存活小鼠, 解剖暴露出肝脏, 留取肝左叶相同部位肝组织, 一半组织放于 4% 多聚甲醛固定, 一半组织保存于 -75 °C 超低温冰箱备用。

5.3 血清肝功能检测 采用全自动生化分析仪检测血清 ALT、AST 水平。

5.4 肝组织病理学观察 取 4% 多聚甲醛固定肝组织, 石蜡包埋, 切片, 厚度为 4 μ m, 常规 HE 染色, 光镜下进行肝组织病理学观察。

5.5 检测肝组织 Nrf2、HO-1、Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达 取 -75 °C 保存的肝组织约 50 mg, 液氮研磨成粉末, 将细胞收集于干净 EP 管中, 按每 1×10^6 个细胞加 200 μ L RIPA 裂解液。将裂解中的样品置于 4 °C 冰箱中, 每隔 5 min 拿出来剧烈震荡 1 min, 重复 6 次, 再将样品 4 °C 12 000 r/min 离心 20 min, 吸上清即为细胞全蛋白。采用 Bradford 法测定蛋白质含量, 置于 -75 °C 冰箱保存备用。变性后每孔加入等量蛋白质样品进行 10% 十二烷基硫酸钠-丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 然后转印至硝酸纤维素膜 (NC 膜)。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 与稀释的一抗 (Nrf2 稀释比为 1:1 000; HO-1 稀释比为 1:5 000; Bcl-2 稀释比为 1:100; Bax 稀释比为 1:1 000; Caspase-3 稀释比为 1:100; β -actin 稀释比为 1:2 000) 4 °C 温育过夜。封闭液漂洗后加入 1:6 000 稀释的二抗, 室温孵育 1 h。漂洗后混合等体积的化学发光液 A 液和 B 液滴于 NC 膜上反应, X 线片曝光, 显影, 定影, 晾干, 然后将胶片进行扫描, 用图像分析软件 IPP6.0 对图像进行灰度分析。

5.6 检测肝组织 Nrf2、HO-1、Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA 表达 取 -75 °C 保存的肝组织约 50 mg, 液氮研磨成粉末, 按说明书用 Trizol 试剂提取总 RNA, 逆转录后进行实时荧光定量 PCR 扩增, 扩增引物由长沙艾佳生物工程有限公司合成, PCR 反应条件: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 10 s, 适宜温度退火延伸 30 s (40 个循环)。反应结束后 CFX96 2.0 软件测定各目的基因相对反应起始拷贝数。见表 1。

表 1 引物序列表

基因名称	引物序列 (5' -3')	扩增长度 (bp)
Bcl-2	正义链: TTCTCTCGTCGCTACCGTCG	123
	反义链: CCAGTTCACCCCATCCCTG	
Caspase-3	正义链: TGGAGAAATTCAAAGGACGG	191
	反义链: AGCATGGACACAATACACGG	
HO-1	正义链: GGAACCTTCAGAAGGGCCAGGT	148
	反义链: TGCAGCTCTTCTGGGAAGTAGACA	
Bax	正义链: GGCTGGACACTGGACTTCCT	289
	反义链: TTCCCACCCCTCCCAATAAT	
Nrf2	正义链: AAAAGGAAAGACAAGAGCAAC	184
	反义链: GGAACAGCGGTAGTATCAGC	
β -actin	正义链: TGGCACCCAGCACAATGAA	186
	反义链: CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA	

6 统计学方法 使用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析。计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本均数间两两比较, 满足方差齐性的采用 LSD 检验, 方差不齐的采用 Dunnett's T3 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 动物一般情况 各组小鼠月龄、体重比较差异均无统计学意义 (P>0.05)。正常组小鼠自由活动、摄食、饮水、精神状态正常; 模型组小鼠造模后 4 h 出现活动明显减少、竖毛、拒食、萎靡等现象, 6 h 症状加剧并出现昏迷、抽搐甚至死亡 2 只; 低、中、高剂量 AS-IV 组小鼠活动能力、摄食、饮水、精神状态均较模型组有所改善。

2 各组小鼠血清 ALT、AST 水平比较 (表 2) 与正常组比较, 模型组小鼠血清 ALT、AST 水平均升高 (P<0.01)。与模型组比较, 低、中、高剂量 AS-IV 组小鼠血清 ALT 活性降低 (P<0.05, P<0.01), 中、高剂量 AS-IV 组 AST 活性降低 (P<0.01)。与低剂量 AS-IV 组比较, 中、高剂量 AS-IV 组小鼠血清 ALT 活性降低 (P<0.01), 高剂量 AS-IV 组 AST 活性亦降低 (P<0.05)。

表 2 各组小鼠血清 ALT、AST 水平比较 (U/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT	AST
正常	10	35.62 $\pm$ 9.17	131.19 $\pm$ 10.23
模型	8	125.20 $\pm$ 2 493.07*	247.33 $\pm$ 1 876.35*
低剂量 AS-IV	10	202.04 $\pm$ 1 364.05 Δ	102.01 $\pm$ 698.94
中剂量 AS-IV	10	2 014.51 $\pm$ 894.27 $\Delta\Delta\Delta$	1 517.08 $\pm$ 102.91 $\Delta\Delta$
高剂量 AS-IV	10	148.77 $\pm$ 59.03 $\Delta\Delta\Delta$	131.82 $\pm$ 68.23 $\Delta\Delta\Delta$

注: 与正常组比较, *P<0.01; 与模型组比较, Δ P<0.05, $\Delta\Delta$ P<0.01; 与低剂量 AS-IV 组比较, Δ P<0.05, $\Delta\Delta$ P<0.01

3 各组小鼠肝组织病理改变 (图 1) 正常组肝小叶结构完整, 无肝组织变性坏死现象; 模型组光镜

下见肝小叶结构被破坏, 肝细胞大片变性坏死, 坏死区炎细胞浸润, 肝窦扩张, 可见淤血及出血; 各剂量 AS-IV 组肝损害程度较模型组轻, 并呈一定的剂量依赖性, 可见肝细胞肿胀, 部分细胞空泡变性, 并见碎片状坏死, 有少量充血和少量炎细胞浸润, 其中高剂量 AS-IV 组肝组织结构基本完整。

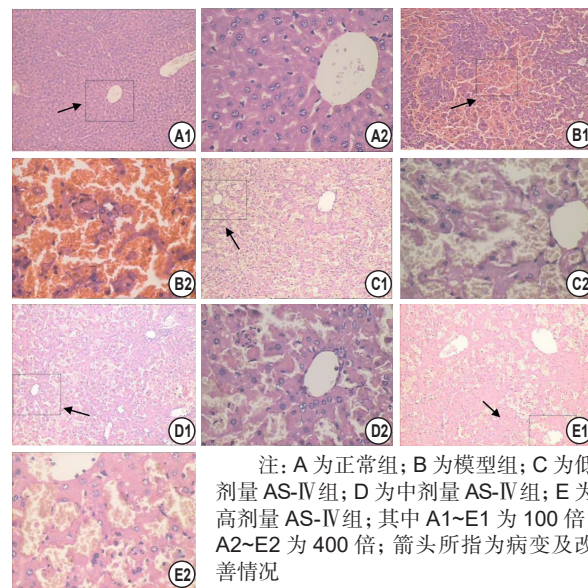


图 1 各组小鼠肝组织病理学改变 (HE)

4 各组小鼠肝组织 Nrf2、HO-1、Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达比较 (图 2, 表 3) 与正常组比较, 模型组小鼠肝组织 Nrf2、HO-1 蛋白表达量, Bcl-2/Bax 蛋白比值均下降 (P<0.01), Caspase-3 蛋白表达增加 (P<0.01)。与模型组比较, 低、高剂量 AS-IV 组 Nrf2 蛋白表达均增加 (P<0.01), 各剂量 AS-IV 组 HO-1 蛋白表达量、Bcl-2/Bax 蛋白比值均升高 (P<0.01), Caspase-3 蛋白表达下降 (P<0.01)。

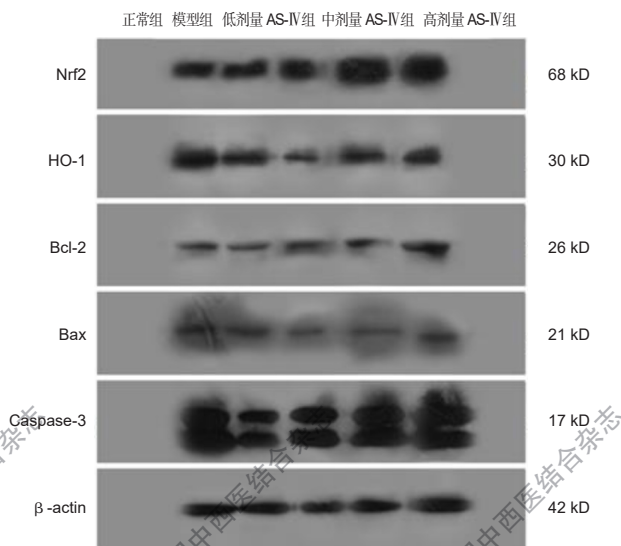


图 2 各组小鼠肝组织蛋白电泳图

表 3 各组小鼠 Bcl-2/Bax、Caspase-3、Nrf2、HO-1 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bcl-2/Bax	Caspase-3/ β -actin	Nrf2/ β -actin	HO-1/ β -actin
正常	10	1.26 $\pm$ 0.24	0.63 $\pm$ 0.13	1.03 $\pm$ 0.05	0.83 $\pm$ 0.04
模型	8	0.30 $\pm$ 0.13*	4.65 $\pm$ 0.43*	0.42 $\pm$ 0.02*	0.50 $\pm$ 0.06*
低剂量 AS-IV	10	0.88 $\pm$ 0.12 $\Delta\Delta$	3.41 $\pm$ 0.31 $\Delta\Delta$	0.54 $\pm$ 0.02 $\Delta\Delta$	0.69 $\pm$ 0.05 $\Delta\Delta$
中剂量 AS-IV	10	1.39 $\pm$ 0.18 $\Delta\Delta\Delta$	2.72 $\pm$ 0.16 $\Delta\Delta$	0.72 $\pm$ 0.29	0.84 $\pm$ 0.05 $\Delta\Delta\Delta$
高剂量 AS-IV	10	1.95 $\pm$ 0.25 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	1.86 $\pm$ 0.15 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	1.15 $\pm$ 0.28 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	1.28 $\pm$ 0.14 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$;与低剂量 AS-IV 组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$;与中剂量 AS-IV 组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$

表 4 各组小鼠 Bcl-2/Bax、Caspase-3、Nrf2、HO-1 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bcl-2/Bax	Caspase-3/ β -actin	Nrf2/ β -actin	HO-1/ β -actin
正常	10	1.11 $\pm$ 0.13	0.85 $\pm$ 0.22	1.30 $\pm$ 0.36	1.81 $\pm$ 0.40
模型	8	0.55 $\pm$ 0.10*	3.58 $\pm$ 0.14*	0.29 $\pm$ 0.10*	1.06 $\pm$ 0.14*
低剂量 AS-IV	10	0.64 $\pm$ 0.09	2.77 $\pm$ 0.15 Δ	0.48 $\pm$ 0.13	2.55 $\pm$ 0.38 $\Delta\Delta$
中剂量 AS-IV	10	0.82 $\pm$ 0.08 $\Delta\Delta\Delta$	2.49 $\pm$ 0.04 $\Delta\Delta$	0.51 $\pm$ 0.12 Δ	3.86 $\pm$ 0.48 $\Delta\Delta\Delta\Delta$
高剂量 AS-IV	10	0.92 $\pm$ 0.14 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	1.32 $\pm$ 0.48 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	1.07 $\pm$ 0.25 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	5.85 $\pm$ 0.36 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$;与低剂量 AS-IV 组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$;与中剂量 AS-IV 组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$

与低剂量 AS-IV 组比较,中、高剂量 AS-IV 组小鼠 HO-1、Bcl-2/Bax 蛋白表达增加 ($P<0.01$),高剂量 AS-IV 组 Nrf2 蛋白表达增加,Caspase-3 蛋白表达下降 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与中剂量 AS-IV 组比较,高剂量 AS-IV 组 HO-1、Bcl-2/Bax 蛋白表达增加,Caspase-3 蛋白表达下降 ($P<0.01$)。

5 各组小鼠肝组织 Nrf2、HO-1、Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA 表达比较(表 4)与正常组比较,模型组小鼠肝组织 Nrf2、HO-1 mRNA 表达量,Bcl-2/Bax mRNA 比值均下调 ($P<0.01$),Caspase-3 mRNA 表达上调 ($P<0.01$)。与模型组比较,中、高剂量 AS-IV 组可上调 Nrf2 mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$),低、中、高剂量 AS-IV 组均可上调 HO-1 mRNA 表达 ($P<0.01$),中、高剂量 AS-IV 组组可上调 Bcl-2/Bax mRNA 比值 ($P<0.01$),低、中、高剂量 AS-IV 组可下调 Caspase-3 mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与低剂量 AS-IV 组比较,中、高剂量 AS-IV 组上调 HO-1、Bcl-2/Bax mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$),高剂量 AS-IV 组上调 Nrf2 mRNA,下调 Caspase-3 mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与中剂量 AS-IV 组比较,高剂量 AS-IV 组上调 HO-1、Nrf2 mRNA 表达,下调 Caspase-3 mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

讨 论

参照文献[3,4],本研究采用 D-GalN 500 mg/kg 和 LPS 10 μ g/kg 共 0.1 mL 联合腹腔注射方法构建

ALF 小鼠模型,结果表明,模型组小鼠血清 ALT、AST 水平较正常组显著增高,符合 ALF 的临床特征,提示造模成功。

中医学理论认为热毒内蕴、瘀血内阻是 ALF 最基本的病因病机,祛邪为主,兼以扶正是本病的基本治则,主要的治法包括凉血散瘀、补益正气。黄芪为豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根,其性温、味甘,是一味传统补气良药。药理研究证明,小剂量黄芪具有抗菌、抗病毒作用,常用量具有益气固表、利水退肿、托毒生肌、强心护肝等功效,大剂量具有增强机体免疫功能、抗氧化自由基损伤作用^[5]。长期毒性试验研究表明黄芪无明显毒性,可较大剂量长期服用,具有广泛的临床应用前景。AS-IV 为黄芪中提取皂苷的有效单体,被认为是黄芪的主要活性成分^[6]。关于 AS-IV 的现代药理研究,近年来有研究表明 AS-IV 对糖尿病大鼠肝损伤、缺氧诱导的血管内皮功能障碍等均有保护作用,表现为降低丙二醛水平,提高超氧化物歧化酶活性,其机制可能与抗氧化机制有关^[7,8]。杨林等^[9]观察到黄芪总苷对颅脑损伤大鼠神经细胞具有显著保护作用,表现为下调 Caspase-3、Bax/Bcl-2 比值,从而保护大鼠的神经功能。然而,对于 AS-IV 治疗 ALF 及其机制研究国内外鲜有报道。前期研究通过建立小鼠 ALF 模型,给予低、中、高不同剂量 AS-IV 干预,发现高剂量 AS-IV 可明显改善小鼠存活率,减轻肝功能损伤及肝细胞凋亡程度,增强肝细胞 SOD 活性,降低 MDA 含量,提示 AS-IV 对 ALF 小鼠具有明确保护作用,

这与抑制细胞凋亡、抗氧化损伤有关^[3],但其具体机制尚不十分清楚。

有研究证实 ALF 的肝组织产生氧化应激损伤,并通过线粒体途径诱导肝细胞凋亡,是其发生发展的重要机制^[1, 2]。抗氧化反应元件(antioxidant response elements, ARE)是机体应对氧化应激损害的防御机制之一。近年来研究发现,转录因子 Nrf2 是 ARE 的激活因子,是机体调节抗氧化应激反应的核心转录因子,具有维持细胞氧化-抗氧化平衡、抑制凋亡、抗炎的多重生物活性。HO-1 是 Nrf2 的相关靶基因,在肝脏内表达,HO-1 靶向性激活可以阻止肝损害的发生及发展^[1, 10]。因此有学者认为,Nrf2-Keap1/ARE 通路可作为治疗以氧化应激为主要发病机制的相关疾病的重要靶标^[2]。本研究通过建立小鼠 ALF 模型,给予不同剂量 AS-IV 预处理,从基因与蛋白两个层面,观察造模后 6 h 各组小鼠肝组织 Nrf2、HO-1 的表达情况,探索 AS-IV 在 ALF 中抗氧化作用机制。结果发现模型组肝组织 Nrf2、HO-1 蛋白及 mRNA 表达量均低于正常组。低、中、高剂量 AS-IV 组小鼠肝组织 Nrf2、HO-1 蛋白及 mRNA 表达量较模型组升高,表明 AS-IV 能有效减低 ALF 氧化应激损伤,其机制可能是通过调节 Nrf2-ARE 信号通路,增强抗氧化蛋白 HO-1 等的表达,从而减轻氧化应激所致急性肝损伤。

细胞凋亡是 ALF 的另一重要发病机制。线粒体是细胞生命活动中心,其功能障碍与肝衰竭的发生发展密切相关。线粒体可通过调控内在信号传导通路促进 Caspase 活化而引起细胞死亡^[11, 12]。线粒体内含有一些与细胞凋亡密切相关的物质,Bcl-2 家族中 Bcl-2 蛋白发挥抗凋亡作用,Bax 蛋白具有促凋亡作用^[13]。Caspase 家族成员在凋亡信号作用下逐级水解活化,最后裂解细胞的结构蛋白和功能蛋白,使细胞分解引起凋亡^[14, 15]。其中“死亡酶”Caspase-3 是最终凋亡执行分子,负责对多种底物蛋白的特异性酶切,从而引起凋亡的激活或灭活。因此,结合 Bcl-2/Bax 比值,对肝组织 Caspase-3 蛋白及 mRNA 表达量进行检测,能够更准确地验证肝细胞凋亡的程度。本研究发现模型组小鼠肝组织 Bcl-2/Bax 比值较正常组明显降低,Caspase-3 蛋白及 mRNA 表达量明显增高,低、中、高剂量 AS-IV 组 Bcl-2/Bax 比值较模型组明显升高,Caspase-3 表达量则明显减低。提示 AS-IV 对 ALF 具有明确的抗凋亡保护作用,其机制可能是通过上调 Bcl-2/Bax 比值,下调 Caspase-3 表达来实现。

综上所述,本研究发现 AS-IV 对 ALF 小鼠具有抗氧化、抗凋亡保护作用,其机制可能是通过调节 Nrf2,增强抗氧化蛋白 HO-1 等的表达,减轻氧化应激所致急性肝损伤;上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,降低 Bax、Caspase-3 水平,从而抑制肝细胞的凋亡。

利益冲突:本研究不存在任何利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 刘丽,李双杰. 转录因子 NF-E2 相关因子 2 与肝脏疾病的关系[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2014, 29 (19): 1500-1502.
- [2] Lee DY, Song MY, and Kim EH. Role of Oxidative stress and Nrf2/KEAP1 signaling in colorectal cancer: mechanisms and therapeutic perspectives with phytochemicals[J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10 (5): 743.
- [3] 刘丽,李双杰,周宇. 黄芪甲苷对实验性急性肝衰竭小鼠的保护作用[J]. 中华肝脏病杂志, 2016, 24 (10): 772-777.
- [4] Tian Y, Ren F, Xu L, et al. Distinct effects of different doses of kaempferol on D-GalN/LPS-induced ALF depend on the autophagy pathway[J]. Mol Med Rep, 2021, 24 (3): 682.
- [5] 王淑华,王红霞. 浅析黄芪不同剂量的药理作用[J]. 浙江中医杂志, 2002, 37 (6): 260-261.
- [6] 刘阳,张云鹏,孙影,等. 中药黄芪长期毒性试验研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18 (29): 3545-3546.
- [7] 赵芳,王洪新,鲁美丽,等. 黄芪甲苷对慢性间歇性缺氧诱导血管内皮功能障碍的保护作用[J]. 中成药, 2022, 44 (10): 3145-3150.
- [8] 徐源,黄存东,李竹青,等. 黄芪甲苷对糖尿病大鼠肝损伤保护作用及其机制研究[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52 (12): 1823-1829.
- [9] 杨林,马宁,陈培莉,等. 黄芪总苷对颅脑损伤大鼠神经细胞氧化应激和凋亡的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2021, 38 (9): 1674-1677.
- [10] 杨慧,赵龙凤,张丽,等. 罗格列酮调控 PPAR- γ /HO-1 的表达抑制肝星状细胞增殖[J]. 中华肝脏病杂志, 2020, 28 (5): 410-415.
- [11] Avni D, Hanikumar KB, Sanyal AJ, et al. Deletion or inhibition of SphK1 mitigates fulminant hepatic failure

by suppressing TNF α -dependent inflammation and apoptosis[J]. FASEB J, 2021, 35 (3): e21415.

[12] Akhigbe RE, Ajayi LO, Adelakun AA, et al. Codeine-induced hepatic injury is via oxido-inflammatory damage and caspase-3-mediated apoptosis[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47 (12): 9521-9530.

[13] 陆红梅, 何玉华, 罗芯怡, 等. 肾衰灌肠液含药血清对 HK-2 细胞缺氧 / 复氧损伤的保护作用及对 Caspase-3、Bax、Bcl-2 mRNA 表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39 (3): 218-222, 后插 22-26.

[14] Li YN, Ning N, Song L, et al. Derivatives of Deoxypodophyllotoxin induce apoptosis through Bcl-2/Bax proteins expression[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2021, 21 (5): 611-620.

[15] 武贞, 黄俊英, 杨莎, 等. 急性胆道感染 SD 大鼠肝细胞凋亡和相关 Bcl-2/Bax 蛋白表达的分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31 (2): 228-232.

(收稿: 2022-01-26 在线: 2023-06-06)
责任编辑: 白 霞

《中国中西医结合杂志》第九届编委会名单

- 总 编 辑 陈可冀
- 副总编辑 王文健 史大卓 吕爱平 肖培根 吴伟康 雷 燕
- 顾 问 王永炎 吴咸中 辛育龄 张伯礼 陈香美 陈凯先 陈维养 唐由之 黄璐琦
曹洪欣 屠呦呦 韩济生
- 编辑委员
- 于德泉 王一涛 王卫霞 王 伟 王 阶 王拥军 (上海) 王拥军 (北京) 王 舒 毛 威
卞兆祥 方邦江 方敬爱 邓跃毅 叶文才 田金洲 史载祥 白彦萍 吕志平 朱立国 朱 兵
朱明军 危北海 刘瓦利 刘龙涛 刘 平 刘 良 刘建平 刘建勋 刘保廷 刘鲁明 齐清会
安冬青 阮新民 孙汉董 孙 燕 阳 晓 花宝金 苏 励 李大金 李军祥 李国栋 李国勤
李 恩 李焕荣 杨任民 杨宇飞 连 方 吴大嵘 吴万垠 吴正治 吴泰相 吴根诚 吴 烈
张大钊 张卫东 张允岭 张永贤 张永祥 张荣华 张俊华 张亭栋 张敏州 张敏建 陆付耳
陈士林 陈士奎 陈小野 陈立典 林志彬 林 谦 林瑞超 郁仁存 果德安 季 光 郑国庆
赵一鸣 赵伟康 赵芳芳 胡义扬 胡晓梅 胡镜清 段金廛 侯凡凡 饶向荣 洪传岳 夏城东
栗原博 (日本) 徐凤芹 徐 浩 凌昌全 高瑞兰 郭 军 郭 姣 郭 艳 郭赛珊 唐旭东
黄光英 梅之南 崔 红 麻 柔 梁 春 梁挺雄 梁晓春 梁繁荣 董竞成 董福慧 谢竹藩
谢明村 谢 恬 蔡定芳 蔡 晶 裴正学 廖福龙 衡先培 魏 玮 Ye-meng CHEN (意大利)
Yung-chi CHENG (美国) Jia-lang HE (美国) Yong-ming LI (美国) Sheng-xing MA (美国)
Qun-hao ZHANG (美国) Joseph ZHOU (美国) Mian-sheng ZHU (法国)
(以上名单按姓氏笔画为序, 编委工作单位信息在本刊网站首页“下载专区”公布, 网址: <http://www.cjim.cn/zxyjhcn/zxyjhcn/ch/index.aspx>)