

楮实子对药物性肝损伤大鼠氧化应激因子的影响

王茜,张一昕*,石铖,郝蕾,韩雪,郭秋红,张晓栋

河北中医学院药学院,河北省高校中药组方制剂应用技术研发中心,石家庄 050200

摘要:为了探讨楮实子对对乙酰氨基酚(APAP)诱导的药物性肝损伤大鼠的保护作用以及对过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR- γ)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR- α)、C-Ros 癌基因1(ROS1)的调控作用。实验将50只SD大鼠随机分为正常组、模型组、水飞蓟宾组(44 mg/kg)和楮实子高、低剂量组(4.2、1.05 g生药/kg),每组10只。灌胃给予对乙酰氨基酚(1.2 kg/kg)制备肝损伤模型,给药组造模的同时给予相应药物治疗,连续30天。实验结束,收集血清、肝组织标本进行指标检测。结果显示,楮实子各剂量均能降低药物性肝损伤大鼠血清中谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)活性,降低总胆红素(TBIL)和直接胆红素(TBIL)的含量,升高血清中谷胱甘肽(GSH)含量、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性,降低丙二醛(MDA)含量以及ROS1的表达,上调PPAR- α mRNA的表达,下调PPAR- γ mRNA的表达。以上研究结果表明,楮实子能防治对乙酰氨基酚所致肝损伤,其作用机制可能是通过降低ROS1的表达、调节转录因子PPAR- α 和PPAR- γ 的基因表达,从而缓解氧化应激损伤来实现的。

关键词:楮实子;药物性肝损伤;ROS1;PPAR- α ;PPAR- γ

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)9-1617-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.9.020

Effect of Broussonetiae Fructus on oxidative stress factors in rats with drug-induced liver injury

WANG Xi, ZHANG Yi-xin*, SHI Cheng, HAO Lei, HAN Xue, GUO Qiu-hong, ZHANG Xiao-dong

Hebei College of Traditional Chinese Medicine, Hebei Higher Education Institute Applied Technology
Research Center on TCM Formula Preparation, Shijiazhuang 050200, China

Abstract: To investigate the protective effect of Broussonetiae Fructus on acetaminophen-induced liver injury in rats and the regulatory effects on peroxisome proliferators activated receptor α (PPAR- α), peroxisome proliferators activated receptor γ (PPAR- γ), and C-Ros oncogene 1 (ROS1). 50 SD rats were randomly divided into normal group, model group, silymarin group (44 mg/kg), Broussonetiae Fructus high and low dose groups (4.2, 1.05 g crude drug/kg) with 10 rats in each group. The rat model of drug-induced liver injury was induced by acetaminophen (1.2 g/kg) orally once daily for 30 days. At the same time of modeling, normal group and model group were given saline infusions by gastric lavage, while the rest groups were given corresponding liquid infusions for 30 days. At the end of the experiment, the activities of AST, ALT, SOD, CAT and GSH-Px, and the contents of TBIL, DBIL, MDA and GSH in serum were measured. Part of the liver tissue was fixed with 4% paraformaldehyde solution, the pathological morphology of the liver was observed with HE staining, and the gene expression of PPAR- α and PPAR- γ were observed by RT-PCR, and the protein expression of ROS1 (C-Ros oncogene 1) was observed by immunohistochemistry. Our results showed that compared with the normal group, the levels of ALT, AST, TBIL and DBIL in rats of the model group were significantly increased, the content of MDA in serum and the gene expression of PPAR- γ in liver were increased, while the levels of SOD, GSH, GSH-Px and PPAR- α were decreased. Compared with the model group, different doses of Broussonetia Fructus could reduce the levels of ALT, AST, TBIL and DBIL, increase the levels of SOD, GSH, GSH-Px in serum, inhibit the gene expression of PPAR- γ and the protein expression of ROS1, and up-regulate the gene ex-

收稿日期:2019-03-21 接受日期:2019-08-13

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81503268);河北省高等学校科学技术研究青年拔尖计划(BJ2016038);中央财政公共卫生专项“2017年中药资源普查项目”(Z135080000022)

*通信作者 Tel:86-311-89926308; E-mail:hbzyx123@163.com

pression of PPAR- α . In conclusion, the results of this study suggest that *Broussonetiae Fructus* may have protective effect on the hepatic injury induced by acetaminophen in rats, and its mechanism may be related to the inhibition of oxidative stress and regulation the gene expression of PPAR- γ , PPAR- α , and the expression of ROS1 protein.

Key words: drug-induced liver injury; *fructus broussonetia*; ROS1; PPAR- γ ; PPAR- α

药物性肝损伤 (drug-induced liver injury, DILI) 是指药物或其代谢产物引起的肝细胞毒性损害或肝脏对药物及代谢产物的变态反应所致的疾病。据报道, DILI 已成为国内外常见且较严重的药源性疾病之一^[1]。研究表明, 氧化应激在药物性肝损伤的发病中具有重要作用, 而过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPARS) 与氧化应激关系密切。过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferators activated receptor alpha, PPAR- α) 和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators activated receptor gamma, PPAR- γ) 属于细胞核受体家族, 其功能状态与肝脏相关疾病 (如脂肪肝、肝炎、肝硬化和肝癌) 的发生密切相关^[2]。

中医学认为, 药物性肝损伤是药毒侵犯机体, 湿热毒邪蕴结体内, 影响肝胆的正常疏泄功能, 从而导致胁痛、黄疸等症状。楮实子 (*Broussonetiae Fructus*) 为桑科植物构树 *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. 的干燥成熟果实, 主入肝经, 味甘性寒无毒, 具有益阴清肝、利水消肿的功效。根据 DILI 湿热毒邪的病机, 楮实子通过清肝, 利水消肿的作用能有效去除湿热邪毒, 且现代研究报道, 楮实子具有保肝及较强的体外抗氧化作用^[3,4]。因此, 本文拟通过观察肝功能指标, 揭示楮实子对药物性肝损伤的保护作用, 通过检测氧化应激指标及 PPAR- α 和 PPAR- γ 的基因表达情况, 初步探讨楮实子可能的作用途径, 为保肝新药的研发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

动物: 清洁级 SD 大鼠 50 只, 雌雄各半, 体质量 180 ~ 220 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物合格证号: 11400700181914, 动物生产许可证号: SCXK(京)2012-0001。

主要试剂与试剂盒: 谷丙转氨酶 (ALT, 批号 AUZ3689) 和谷草转氨酶 (AST, 批号 AUZ3645) 测定试剂盒均购自贝克曼库尔特实验系统有限公司; 总胆红素 (TBIL, 批号 A005) 和直接胆红素 (DBIL, 批号 A006) 试剂盒均购自长春汇力生物技术有限公司; 超氧化物歧化酶 (SOD, 批号 A001-1), 谷胱甘肽

(GSH, 批号 A006-1), 丙二醛 (MDA, 批号 A003-2), 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px, 批号 A005), 过氧化氢酶 (CAT, 批号 A007-1) 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; Trizol (批号: 139603), 购自 invitrogen 公司; TIANScriptcDNA 第一链合成试剂盒 (批号: P5011), SuperRealPreMix Plus (SYBR Green, 批号: Q5922) 均购自天根生化科技 (北京) 有限公司; Anti-ROS1 Rabbit Polyclonal Antibody (批号: D829AA0353), 购自 ORIGENE 公司。

主要仪器: Humalyzer2000 半自动生化分析仪 (德国豪迈公司)、HMIAS-2000 显微图像分析系统 (武汉同济大学)、荧光定量 PCR 仪 ABI7500 (Applied Biosystems)、DP73 数码显微镜 (日本 Olympus)。

1.2 实验方法

1.2.1 楮实子药液制备

楮实子 (CSZ) 选用广东一方制药有限公司生产的中药配方颗粒 (批号: 11080711, 当量比为 7:1), 实验时将楮实子的实验用生药剂量按照当量比换算为配方颗粒的剂量, 用 100 °C 蒸馏水充分溶解, 冷贮备用。

1.2.2 动物分组与造模

将 50 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 按体重随机分为 5 组, 每组 10 只, 即: 正常组、模型组、水飞蓟宾组、楮实子低、高剂量组 (简称低剂量组、高剂量组)。除正常组给予蒸馏水灌胃以外, 其余各组用对乙酰氨基酚溶液 1 200 mg/kg (用 40 °C 生理盐水配制) 每日灌胃 1 次, 连续 30 天。

1.2.3 给药方法

从造模第 1 天起, 上午造模, 下午正常组和模型组给予蒸馏水灌胃, 阳性药和楮实子各剂量组均给予相应药物。结合临床应用, 选择临床成人 1 日常用剂量 10 g 作为楮实子低剂量, 40 g 作为楮实子高剂量, 按照人与大鼠体表系数法转换为实验用量, 低、高剂量组大鼠每日用药剂量分别为 1.05、4.2 g 生药/kg; 水飞蓟宾组为 44 mg/kg。每次用药体积均为 1 mL/100 g, 连续给药 30 天, 自由进食水, 每 5 天称体重一次, 根据体重更换灌胃体积。

1.2.4 样本制备及相关生理生化指标检测

最后一次灌胃给药后, 各组大鼠禁食不禁水 16 h, 3.5% 水合氯醛麻醉后腹主动脉取血, 分别置于洁净试管和肝素抗凝管中, 4 000 rpm, 离心 20 min, 分离血清和血浆, 采用全自动生化分析仪检测 ALT 和 AST 活性、DBIL 和 TBIL 含量; 采用紫外分光光度仪按照南京建成试剂盒说明书测定血清中 SOD、GSH-PX 和 CAT 的活性, GSH 和 MDA 的含量。各组大鼠取血后, 迅速剖腹取出肝脏, 分成若干小块, 取一部分置于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 连续切片, HE 染色, 光镜观察肝组织的形态学变化, 运用免疫组化法检测 ROS1 的蛋白表达; 再取一部分置于冻存管中液氮冻存, -80 °C 冰箱保存, RT-PCR 技术检测肝组织中 PPAR- γ mRNA、PPAR- α mRNA 的表达。

1.2.5 RT-PCR

称取 100 mg 肝脏组织, 磨碎, 加入 Trizol 1 mL, 冰上匀浆, 提取总 RNA。参照逆转录试剂盒说明进行逆转录反应, 获得 cDNA。取 5 μ L RNA 用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 以检测其完整性。将完整的 cDNA 进行实时荧光定量 PCR 反应, 分别用目的基因引物和内参基因引物进行扩增, 同时在 60 ~ 95 °C 进行溶解曲线分析, 检测 PPAR- γ 、PPAR- α 的基因表达, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行数据的相对定量分析。 β -actin 上游引物 5'-CCTCCTGAACTTGAGGCAGTTTA-3', 下游引物 5'-CTCTGGGGCTGTCAGTCTTG-3', PPAR- α 上游引物为 5'-GAAAGATTTCGGAACTGC-

3', 下游引物为 5'-TCCTGCGAGTATGACCC-3'; PPAR- γ 上游引物为 5'-TGGGCGAATGCCACAGG-3', 下游引物为 5'-TTTGGTCAGCGGGAAGG-3'。

1.2.6 免疫组化

将多聚甲醛固定的肝组织制作成病理蜡块, 切片后按照试剂盒说明用免疫组化法观察 ROS1 的阳性表达, 通过软件分析所测阳性反应物相对含量的灰度值及面积, 由积分光密度值 (IOD) 和平均光密度值 (MOD) 来表示。

1.3 统计学分析

实验数据采用 SPSS13.5 软件进行处理, 计量资料多组间比较采用方差分析, 方差齐选用 LSD, 方差不齐选用非参数检验方法; 以 $P < 0.05$ 有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 楮实子对 APAP 肝损伤大鼠血清肝功能指标的影响

与正常组比较, 模型组大鼠血清中 ALT 和 AST 活性、DBIL 含量均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、TBIL 含量有升高趋势, 但无统计学差异 ($P > 0.05$)。药物干预后, 各用药组 ALT 和 AST 活性、DBIL 和 TBIL 的含量均较模型组降低。其中水飞蓟宾组和低剂量组 ALT、AST 活性降低明显 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 高剂量组 AST 活性及 DBIL 含量显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与高剂量组比较, 楮实子低剂量组 AST 活性的降低更明显 ($P < 0.05$) (见表 1)。

表 1 楮实子对 APAP 肝损伤大鼠血清 ALT、AST、DBIL、TBIL 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effects of CSZ on rats serum levels of ALT, AST, DBIL and TBIL ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	DBIL (μ mol/L)	TBIL (μ mol/L)
正常组 Normal	-	72.81 \pm 9.83	187.67 \pm 30.25	1.56 \pm 0.12	2.58 \pm 0.34
模型组 Model	-	97.51 \pm 18.79 $\Delta\Delta$	236.49 \pm 41.32 $\Delta\Delta$	2.42 \pm 0.34 Δ	3.19 \pm 0.81
水飞蓟宾组 Silymarin	0.044	80.36 \pm 14.07 Δ	190.46 \pm 29.98 $\Delta\Delta$	2.12 \pm 0.38 Δ	2.70 \pm 0.74
低剂量组 CSZ-L	1.05	66.49 \pm 8.54 $\Delta\Delta$	175.78 \pm 30.12 $\Delta\Delta$ *	2.02 \pm 0.37	2.62 \pm 0.99
高剂量组 CSZ-G	4.2	84.63 \pm 21.61	200.35 \pm 34.49 $\Delta\Delta$	1.69 \pm 0.62 Δ	2.46 \pm 0.97

注: 与正常组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与高剂量组比较, $*$ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with normal group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; Compared with model group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; Compared with high dose group, $*$ $P < 0.05$.

2.2 楮实子对 APAP 肝损伤大鼠肝组织病理形态学的影响

正常组大鼠肝小叶结构完整, 肝索以中央静脉为中心呈放射状排列整齐, 肝细胞形态正常, 未见明

显病理改变。模型组肝小叶结构破坏, 肝索排列紊乱, 广泛性肝细胞气球样变并伴有坏死。水飞蓟宾对照组和楮实子各给药组大鼠仅在中央静脉周围出现局部的肝细胞气球样变。尤其是水飞蓟宾对照组

和低剂量楮实子组肝损伤程度最轻,仅出现个别肝细胞气球样变情况(见图1)。

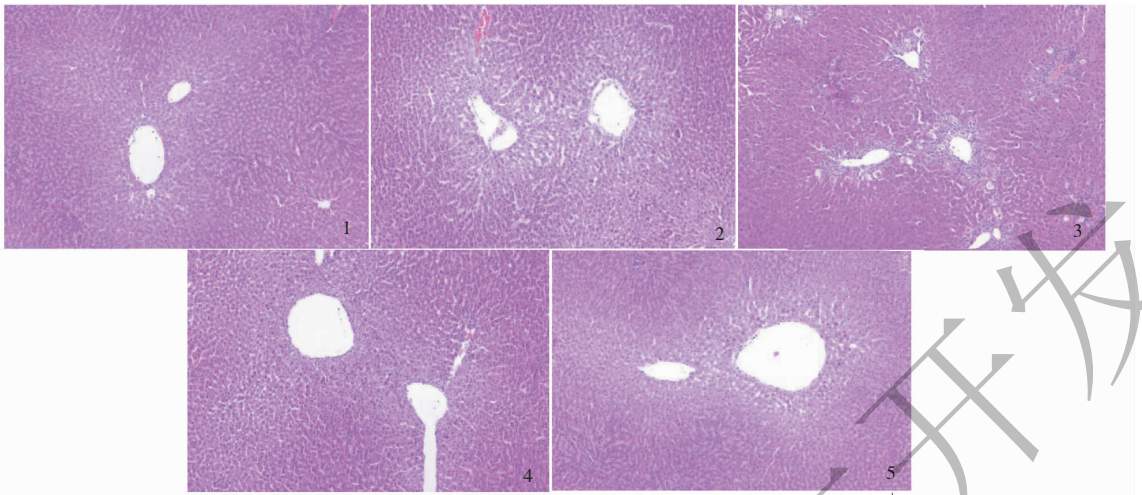


图1 楮实子对 APAP 肝损伤大鼠肝组织病理形态学的影响(HE,100×)

Fig. 1 Effects of CSZ on the morphology of mouse liver tissues(HE,100×)

注:1. 正常组;2. 模型组;3. 水飞蓟宾组;4. 楮实子低剂量组;5. 楮实子高剂量组。

Note: 1. Normal; 2. APAP; 3. APAP + silymarin; 4. APAP + CSZ (1.05 g/kg); 5. APAP + CSZ (4.2 g/kg).

2.3 楮实子对 APAP 肝损伤大鼠氧化应激指标的影响

与正常组比较,模型组大鼠血清中 MDA 含量显著升高($P < 0.01$),GSH 含量、SOD 和 GSH-PX 活性显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,水飞蓟宾组 MDA 含量降低($P < 0.05$),SOD 活

性显著升高($P < 0.01$);高、低剂量楮实子组 GSH 含量、SOD 和 GSH-PX 活性均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与水飞蓟宾组比较,低剂量组 GSH 含量显著升高($P < 0.01$)。各组 CAT 活性无明显统计学差异($P > 0.05$)。见表 2 和表 3。

表 2 楮实子对 APAP 肝损伤大鼠血清 MDA、GSH 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of CSZ on serum contents of MDA and GSH($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	MDA ($\mu\text{mol/L}$)	GSH (mg/L)
正常组 Normal	-	4.84 \pm 0.44	188.86 \pm 22.10
模型组 Model	-	5.70 \pm 0.67 $\Delta\Delta$	164.63 \pm 28.69 Δ
水飞蓟宾组 Silymarin	0.044	5.05 \pm 0.61 \blacktriangle	171.73 \pm 28.18
低剂量组 CSZ-L	1.05	5.35 \pm 0.43	210.30 \pm 28.48 $\blacktriangle\blacktriangle\ast\ast$
高剂量组 CSZ-G	4.2	5.46 \pm 0.45 Δ	190.44 \pm 31.58 \blacktriangle

注:与正常组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$;与水飞蓟宾组比较, $\ast\ast P < 0.01$ 。

Note: Compared with normal group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; Compared with model group, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$; Compared with silymarin group, $\ast\ast P < 0.01$.

表 3 楮实子对 APAP 肝损伤大鼠血清 SOD、GSH-PX、CAT 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effects of CSZ on serum activity of SOD, GSH-PX and CAT($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	SOD (U/mL)	GSH-PX (U/mL)	CAT (U/mL)
正常组 Normal	-	215.79 \pm 18.44	974.20 \pm 221.45	2.19 \pm 0.23
模型组 Model	-	183.28 \pm 29.25 Δ	738.61 \pm 221.08 Δ	2.02 \pm 0.25
水飞蓟宾组 Silymarin	0.044	226.61 \pm 31.00 $\blacktriangle\blacktriangle$	924.64 \pm 271.35	2.07 \pm 0.21
低剂量组 CSZ-L	1.05	227.45 \pm 29.13 $\blacktriangle\blacktriangle$	1125.08 \pm 203.08 $\blacktriangle\blacktriangle$	1.97 \pm 0.33 Δ
高剂量组 CSZ-G	4.2	250.25 \pm 20.97 $\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle$	1110.93 \pm 266.09 $\blacktriangle\blacktriangle$	2.14 \pm 0.24

注:与正常组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ 。

Note: Compared with normal group, $\Delta P < 0.05$; Compared with model group, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$.

2.4 楮实子对 APAP 肝损伤大鼠肝组织中 PPAR- α 、PPAR- γ mRNA 表达的影响

与正常组比较,模型组、水飞蓟宾组、高、低剂量楮实子组 PPAR- α mRNA 表达水平均显著降低($P < 0.01$), PPAR- γ mRNA 表达水平升高,其中模型组、水飞蓟宾组、低剂量组表达升高有统计学差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与模型组比较,水飞蓟宾组、高、

低剂量组 PPAR- α mRNA 表达水平均升高, PPAR- γ mRNA 表达水平均降低,其中高、低剂量组的调控作用尤为明显($P < 0.01$);与水飞蓟宾组比较,高、低剂量组 PPAR- α mRNA 表达水平均显著提高($P < 0.01$), PPAR- γ mRNA 表达水平均降低($P < 0.01$);与高剂量组比较,低剂量组 PPAR- α mRNA 表达水平降低($P < 0.05$)(见表 4)。

表 4 楮实子对 APAP 肝损伤大鼠肝组织中 PPAR- α 、PPAR- γ mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effects of CSZ on the expression of PPAR- α and PPAR- γ genes in the liver of rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	PPAR- α mRNA	PPAR- γ mRNA
正常组 Normal	-	1.11 \pm 0.13	0.99 \pm 0.13
模型组 Model	-	0.13 \pm 0.10 $\Delta\Delta$	4.25 \pm 1.33 $\Delta\Delta$
水飞蓟宾组 Silymarin	0.044	0.18 \pm 0.77 \blacktriangle	3.79 \pm 1.25
低剂量组 CSZ-L	1.05	0.51 \pm 0.20 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$	2.21 \pm 1.07 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$
高剂量组 CSZ-G	4.2	0.72 \pm 0.20 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$	1.64 \pm 0.63 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$

注:与正常组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$;与水飞蓟宾组比较, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$;与高剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。
Note: Compared with normal group, $\Delta\Delta P < 0.01$; Compared with model group, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$; Compared with silymarin group, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$; Compared with high dose group, $\blacktriangle P < 0.05$.

2.5 楮实子对 APAP 肝损伤大鼠肝组织中 ROS1 表达的影响

正常组阳性细胞表达相对较少,着色较浅,模型组大鼠肝组织的细胞阳性表达相对较多,着色较深。对照组、低、高剂量楮实子组阳性细胞的表达及着色程度降低。模型组大鼠肝组织中 IOD 和 MOD 较正

常组升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);各用药组 IOD 和 MOD 均低于模型组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),其中,IOD 高、低剂量组高于对照组($P < 0.01$),高剂量组低于低剂量组($P < 0.01$);MOD 高、低剂量均高于对照组,但无统计学意义($P > 0.05$)(见表 5,图 2)。

表 5 楮实子对 APAP 肝损伤大鼠肝组织中 ROS1 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 Effects of CSZ on the expression of ROS1 protein in the liver of rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	积分光密度 (IOD)	平均光密度 (MOD)
正常组 Normal	-	68.45 \pm 20.54	0.23 \pm 0.13
模型组 Model	-	305.05 \pm 73.33 $\Delta\Delta$	0.48 \pm 0.22 Δ
水飞蓟宾组 Silymarin	0.044	57.56 \pm 16.20 $\blacktriangle\blacktriangle$	0.21 \pm 0.13 \blacktriangle
低剂量组 CSZ-L	1.05	184.90 \pm 59.65 $\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$	0.41 \pm 0.22
高剂量组 CSZ-G	4.2	91.25 \pm 21.66 $\blacktriangle\blacktriangle$	0.27 \pm 0.19 \blacktriangle

注:与正常组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ 与水飞蓟宾组比较, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$;与高剂量组比较, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ 。
Note: Compared with normal group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; Compared with model group, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$; Compared with silymarin group, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$; Compared with high dose group, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$.

3 结论

ALT 和 AST 是临床应用最广泛的反映肝细胞损伤的生化指标,但在药物性肝损伤的早期诊断及识别方面具有一定的局限性^[5]。有文献报道,胆红素增高是药物性肝炎死亡及肝衰竭的最佳预测指标。TBIL 和 DBIL 的正常代谢依赖于肝细胞,当肝脏发生炎症、坏死、中毒等损害时,一方面肝脏无法

完全摄取和结合 TBIL,另一方面肝细胞内的 DBIL 会从受损的肝细胞释出,因此导致血液中 DBIL 和 TBIL 均升高^[6]。本实验结果显示,与正常组比较,模型组 AST、ALT 活性和 DBIL 含量显著升高,肝细胞变性、坏死,提示药物性肝损伤模型成功。采用不同剂量的楮实子给药,结果显示楮实子各剂量组血清 ALT、AST 活性和 DBIL、TBIL 含量降低,肝细胞

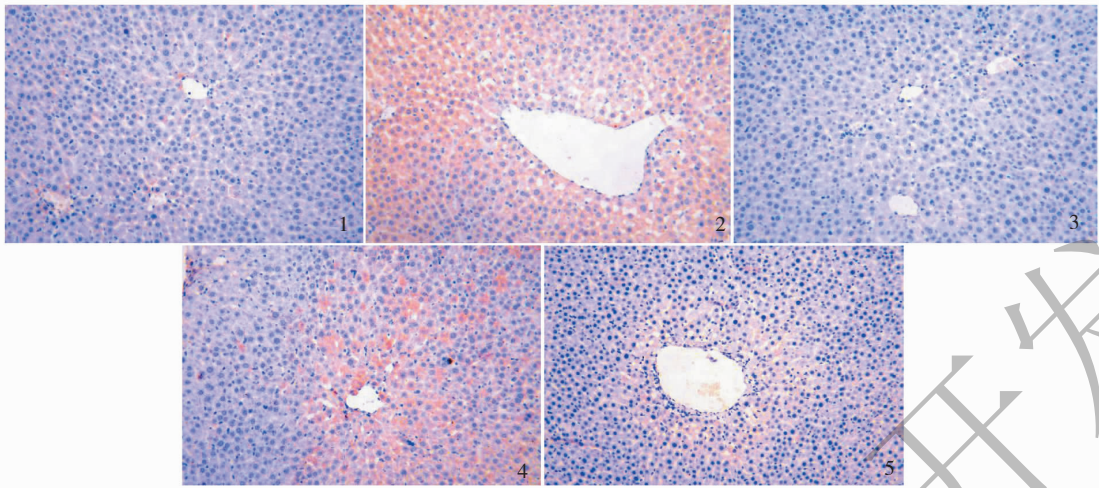


图2 楮实子对 APAP 肝损伤大鼠肝组织中 ROS1 蛋白表达的变化(免疫组化, 200 ×)

Fig. 2 Effects of CSZ on the expression of ROS1 protein in the liver of rats(SP, 200 ×)

注: 1. 正常组; 2. 模型组; 3. 水飞蓟宾组; 4. 楮实子低剂量组; 5. 楮实子高剂量组。

Note: 1. Normal; 2. APAP; 3. APAP + silymarin; 4. APAP + CSZ (1.05 g/kg); 5. APAP + CSZ (4.2 g/kg).

变性程度较模型组减轻, 表明楮实子对药物性肝损伤有良好的修复作用。

文献报道氧化应激是对乙酰氨基酚导致肝损伤的重要机制^[7], 对乙酰氨基酚 (APAP) 过量可引起线粒体氧化损伤、肝细胞坏死, 从而导致急性肝衰竭。而作为脂质过氧化反应的终产物之一, MDA 是机体内反映氧化损伤程度的经典指标之一。同时肝脏还有多种抗氧化物酶, 可抵抗自由基损伤, 如 SOD、CAT 和 GSH-Px 共同形成抗氧化物酶体系^[8]。GSH 是一种低分子自由基清除剂, 又是 GSH-Px 的底物, 能防止细胞因子受氧化损伤。脂质过氧化作用将活性氧转化为活性化学剂, 通过链式或链式支链反应放大活性氧的作用, 同时由于活性氧积聚, 使肝组织的抗氧化物质消耗增加, 使 SOD、CAT、GSH-Px、GSH 表达量下降^[9]。实验结果表明, 模型组大鼠肝组织 MDA 含量高于正常组, SOD、GSH-Px 和 GSH 水平明显低于正常组, 提示肝损伤大鼠有脂质过氧化损伤及抗氧化物酶体系的减弱。而楮实子各剂量组的肝组织 MDA 含量低于模型组, SOD、GSH-Px 和 GSH 水平高于模型组, 提示其具有抗氧化, 清除自由基的作用。

ROS1 是 II 类受体酪氨酸激酶的胰岛素受体基因, 被认为是多种信号通路的启动因子, 在正常的机体状态下其被严格控制不发挥作用, 一旦受到致病因子的刺激, 则可诱导细胞发生氧化应激反应^[10]。因此, ROS1 可认为是氧化应激发生的一个启动因

子, 如果能抑制 ROS1 的表达, 则可延缓或抑制氧化应激的发生发展过程。PPAR- α 和 PPAR- γ 均是配体活化的转录因子, 属于核激素受体超家族成员。近年来研究发现, PPAR- α 及其配体对氧化应激诱导的药物性肝损伤有良好的调控作用, 激活 PPAR- α 可抑制肝细胞缺氧/复氧损伤的脂质过氧化反应, 减轻大鼠肝细胞缺氧/复氧损伤的氧化应激损伤, 保护肝功能。PPAR- γ 可被特异性配体激活而在细胞增殖分化、炎症调控、凋亡、抑制肝脏氧化应激过程中发挥重要作用^[11-13]。刘芳等研究发现, PPAR- γ 的表达在 LPS/D-GalN 诱导的急性肝损伤模型组中显著增高, 与以往研究结果相反, 认为在急性肝损伤中 PPAR- γ 的表达升高可能是一种应激性反应^[14]。另有文献报道, 肝细胞中 PPAR- γ 的表达可抑制脂代谢, 促进肝脏脂肪变性^[15]。本文结果显示, 模型组大鼠 ROS1 蛋白表达以及 PPAR- γ 基因表达高于正常组, 而 PPAR- α 基因表达低于正常组, 楮实子各剂量组 ROS1 蛋白的表达和 PPAR- γ 基因表达均有不同程度的降低, PPAR- α 基因表达基因表达有不同程度的升高, 以高剂量组效果较好。

综上所述, 楮实子能有效防治对乙酰氨基酚所致肝损伤, 其机制可能与 ROS1 蛋白控制了氧化应激的启动, 转录因子 PPAR- α 对药物性肝损伤所发生的氧化应激起到正向调控的作用, PPAR- γ 则为反向调控的作用, 结合文献报道分析 PPAR- γ 是否对氧化应激性损伤发挥保护作用有争议, 一方面认

为 PPAR- γ 过表达为机体抗炎的应激性反应。另一方面,PPAR- γ 过度表达通过抑制脂代谢,促进肝脏脂肪变性。因此,后续实验会选择加入 PPAR- γ 的激动剂或抑制剂,设置不同的对乙酰氨基酚给药时间、给药剂量,观察氧化应激、炎性因子、脂质代谢、PPAR- γ 等指标的变化,以期最终揭示楮实子对 PPAR- γ 的反向调控是否为保肝作用的机制。

参考文献

- 1 Shen T, Liu Y, Shang J, et al. Incidence and etiology of drug-induced liver injury in mainland China. [J]. *Gastro*, 2019, 2:1-12.
- 2 Zhao CY, Jiang LL. Relationship between peroxisomal proliferator-activated receptors and liver disease [J]. *Chin J Hepatol* (中华肝病杂志), 2003, 6:63-65.
- 3 Zhang J, Wang WL, Peng HY. Review of clinical and laboratory study on traditional Chinese herbal medicine fructus broussonetiae [J]. *Chin Arch Trad Chin Med* (中华中医药学刊), 2014, 32:75-78.
- 4 Pang SQ, Wang GQ, Qin LP, et al. Antioxidation activities of fructus broussonetia haematochrome *in vitro* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2006, 3:262-265.
- 5 Li F, Lu LG. Evaluation of abnormal liver function and its clinical significance [J]. *J Clin Hepatol* (临床肝胆病杂志), 2015, 31:1543-1546.
- 6 Zhang FB, Luo GM, Xiao RC, et al. Protective effect of gardenia oil on carbon tetrachloride acute liver injury in mice [J]. *Chin O&F* (中国油脂), 2017, 42:128-131.
- 7 Chen JB, Xu Z, Qin XY, et al. Advances on mechanisms of acetaminophen-induced hepatic injury [J]. *J Prac Med* (实用医学杂志), 2012, 28:3479-3480.
- 8 Shu GW, Qiu YH, Li W, et al. Protective effects of total alkaloids from lotus leaf on acetaminophen-induced acute liver injury in mice: role of activating hepatic AMPK/Nrf2 signaling [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2019, 31:198-203.
- 9 Wang WB, Shu H, Ren P. Protective effects of salvia miltiorrhiza injection on acute alcohol induced liver lipid peroxidation in mice [J]. *J Xianning Univ: Med Sci* (咸宁学院学报:医学版), 2012, 26:279-282.
- 10 Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30:863-870.
- 11 Yang YW, Yuan J. Advances on antioxidative stress of PPAR α [J]. *J Southeast Univ: Med Sci* (东南大学学报:医学版), 2016, 35:147-150.
- 12 Chen ZZ, Cui QH, Yang JC. The protective effect and mechanism of PPAR in organ ischemia reperfusion injury [J]. *Pro Phy Sci* (生理科学进展), 2017, 48:63-68.
- 13 Wang JX. Protective effect and mechanism of rosiglitazone on APAP acute liver injury [D]. Hefei: Anhui Medical University (安徽医科大学), 2017.
- 14 Liu F, Zhao SM, Zhang W, et al. Inhibitory effects of seabuckthorn polysaccharide on oxidative stress in mice with acute liver injury and modulatory effect on BCL-2/Bax and PPAR- γ expression [J]. *Chin J Immun* (中国免疫学杂志), 2016, 32:358-361.
- 15 Zhang Y, Cui Y, Wang XL, et al. PPAR α/γ agonists and antagonists differently affect hepatic lipid metabolism, oxidative stress and inflammatory cytokine production in steatohepatic rats [J]. *Cyto*, 2015, 75:127-135.