

文章编号:1001-6880(2018)6-0944-07

金边桑叶多酚提取物抗氧化及肝保护作用研究

吴黉坦^{1,2},张友珍²,黄立森^{1,2},庞海月^{1,2},陈煜沛^{1,2},王贵弘^{1,2},叶子坚^{1*},刘华欣^{3,4*}¹厦门医学院医学技术系;²天然化妆品福建省高校应用技术工程中心;³厦门医学院基础医学部;⁴机能与临床转化福建省高校重点实验室,厦门 361023

摘要:本实验以金边桑叶为研究对象,通过水提法制得粗提物 AWE,后经大孔树脂分离纯化制得金边桑叶多酚提取物 AWF,在探讨 AWE 和 AWF 体外抗氧化(清除自由基)能力的基础上,进一步探究了 AWF 对乙酰氨基酚(APAP)诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用及其作用机制。AWE 和 AWF 多酚含量分别为 224.9 ± 1.5 和 $608.7 \pm 16.4 \mu\text{g GAE/mg extract}$,且 AWF 对 DPPH 和 ABTS 自由基具有较强的清除能力,其 IC_{50} 值分别为 4.46 和 $41.25 \mu\text{g/mL}$ 。中、高剂量 AWF(200 和 400 mg/kg · bw)灌胃处理能显著改善 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤,使肝损伤小鼠血清中 ALT、AST 和 LDH 活力及 MDA 含量降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$),血清中 SOD 和 CAT 及肝脏中 GSH-Px 活力升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),免疫组化结果也显示肝脏组织损伤情况明显减轻。此外 AWF 可显著抑制损伤肝脏组织中 MAPKs 及促凋亡蛋白 caspase-3/9 的活化,下调促凋亡蛋白 Bax 并上调抗凋亡蛋白 Bcl2 的表达量。实验结果表明,AWF 可改善 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤,其作用可能是通过调控 MAPKs/apoptosis 级联反应,发挥抗氧化和抗凋亡作用来实现的。

关键词:金边桑叶;急性肝损伤;抗氧化;抗凋亡

中图分类号:R965;Q946.91

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.6.005

Antioxidant and Hepatoprotective Effects of Polyphenols in *Acalypha wilkesiana* Leaves

WU Hong-tan^{1,2}, ZHANG You-zhen², HUANG Li-sen^{1,2}, PANG Hai-yue^{1,2}, CHEN Yu-pei^{1,2}, WANG Gui-hong^{1,2}, YE Zi-jian^{1*}, LIU Hua-xin^{3,4*}¹Department of Medical Technology, Xiamen Medical College; ²Application Technique Engineering Center of Natural Cosmeceuticals, College of Fujian Province;³Department of Basic Medicine, Xiamen Medical College; ⁴Key Laboratory of Functional and Clinical Translational Medicine, Fujian Province University, Xiamen 361023, China

Abstract: In this experiment, a crude extract named as AWE was extracted by water extraction from *Acalypha wilkesiana* leaves, and then a polyphenol-enriched fraction was prepared by macroporous resin, designated as AWF. Based on the results of free radical scavenging activities of AWE and AWF *in vitro*, the hepatoprotective effects of AWF and the underlying mechanisms were further investigated by APAP-induced acute liver injury mice model. Results showed that the polyphenol contents in AWE and AWF reached 224.9 ± 1.5 and $608.7 \pm 16.4 \mu\text{g GAE/mg extract}$, respectively. AWF exhibited strong scavenging abilities on DPPH and ABTS free radicals, the IC_{50} s were 4.46 and $41.25 \mu\text{g/mL}$, respectively. AWF (200 and 400 mg/kg · bw) pretreatment significantly alleviated APAP-induced acute liver injury, as evidenced by the decreased serum levels of ALT, AST, LDH, and MDA ($P < 0.05$ or $P < 0.001$), and the elevated activities of SOD, CAT, and GSH-Px ($P < 0.01$ or $P < 0.001$), the results of which were further confirmed by the histopathological analysis. Moreover, AWF remarkably inhibited the activation of MAPKs and proapoptotic protein caspase-3/9, down-regulated the expression level of proapoptotic protein Bax and restored the expression level of antiapoptotic protein Bcl2. These results indicate that AWF possesses hepatoprotective effects against APAP-induced liver injury, which may be attributed to the antioxidant and antiapoptotic effects through the modification of MAPKs/apoptosis cascade reaction.

Key words: *Acalypha wilkesiana* leaves; acute liver injury; antioxidant; antiapoptotic effect

收稿日期:2018-02-05

接受日期:2018-04-12

基金项目:福建省高校杰出青年科研人才培育计划;厦门医学院校级科研计划(博士启动基金)(K2016-09)

*通信作者 E-mail:yzj@xmme.edu.cn;lhx@xmme.edu.cn

对乙酰氨基酚(N-acetyl-p-aminophenol, APAP)是临幊上应用最为广泛的解热镇痛药,但过量服用可引起毒性代谢产物大量堆积而造成严重的肝损伤^[1]。药物代谢动力学研究表明,APAP进入体内后大部分会与葡萄糖醛酸等结合生成缀合物而排毒;少部分则在细胞色素P450酶系作用下代谢为毒性中间代谢产物N-乙酰基-对苯醌亚胺(N-acetyl-p-benzoquinone imine, NAPQI)。少量NAPQI会与体内的谷胱甘肽(glutathione, GSH)结合形成半胱氨酸衍生物而解毒;大量生成时,体内GSH耗尽,过量NAPQI和肝细胞中的蛋白质等大分子物质结合,同时产生大量自由基,诱发脂质过氧化,破坏细胞膜而引起肝细胞坏死^[2,3]。近年研究表明,线粒体损伤和自由基堆积引起的氧化应激是APAP致肝损伤的主要原因^[4,5]。因此,寻找能减轻或治疗APAP诱发的急性肝损伤的天然产物,尤其是天然抗氧化剂已成为国内外研究人员关注的热点^[6-8]。

多酚类化合物广泛存在于各种植物中,具有抗氧化、抗炎、降血脂和防止动脉硬化等作用,同时由于多酚类化合物能通过清除自由基来防止氧化性损伤,再加上其在医疗和健康保健等方面的开发潜质已引起药学工作者的浓厚兴趣^[9,10]。金边桑(*Acalypha wilkesiana*)又名金边红桑,是一种药用观赏植物,广泛分布在我国东南沿海各地,药用部位为叶,含有三萜、单宁和多酚类等成分,具有清热凉血、镇痛退热等功效^[11,12]。本实验先前研究发现,金边桑叶多酚类化合物含量较高,但目前关于金边桑叶缓解氧化应激,保护APAP致急性肝损伤及其作用机制尚无文献报道,故本文以大孔树脂分离纯化制得金边桑叶多酚提取物AWF,利用APAP诱导的急性肝损伤小鼠模型,观察其对小鼠肝脏组织的结构形态、生化指标和相关信号通路的影响;探讨AWF对APAP诱导的肝损伤小鼠的保护作用,分析其可能的作用机制,并为金边桑资源的开发利用以及APAP等致药源性肝损伤的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

C57BL/6雄性小鼠40只,体重 20 ± 2 g,SPF级,由厦门大学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(闽)-2013-0001。

1.2 材料及试剂

金边桑叶由福建省农科院生态所林忠宁副研究

员提供;维生素C(Vc)、没食子酸标准品和福林酚试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)购自日本东京化成工业株式会社;大孔吸附树脂D101(国药集团化学试剂有限公司);总抗氧化能力检测试剂盒(ABTS法)购自上海碧云天生物技术研究所;丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、过氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;苏木精-伊红染色液(湖南艾佳生物科技股份有限公司);caspase-3、cleaved caspase-3、caspase-9、cleaved caspase-9、Bax、Bcl2、JNK、p-JNK、p38、p-p38、ERK1/2、p-ERK1/2和GAPDH抗体(美国Cell Signaling Technology公司),其余试剂均为国产化学分析纯。

1.3 仪器与设备

Leica RM2235切片机(德国Leica Biosystem公司);5417R台式高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);SpectraMax® I3多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司);EYEL4旋转蒸发仪(东京理化器械株式会社);GZX-DH. 500-BS-II电热恒温干燥箱(上海跃进医疗器械有限公司);BSA124S电子天平(德国Sartorius公司);GNP-9080隔水式电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司);TS-200脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);VE186转移电泳槽、VE180微型垂直电泳槽和EPS600电泳仪(上海天能科技有限公司);ChemiDoc™ XRS+化学发光成像系统(美国Bio-Rad公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 金边桑叶多酚提取物的制备

取金边桑叶粉末100g,加入1000mL去离子水,100℃煎煮30min,过滤后将滤液于旋转蒸发仪上浓缩,除去大量溶剂后置于冻干机上冷冻干燥,得到粗提物AWE(a crude extract from *Acalypha wilkesiana* leaves),低温避光存放。

玻璃层析柱固定后下端加脱脂棉,装入适量经乙醇活化的大孔吸附树脂D101,用蒸馏水洗至柱中无乙醇并保证柱内无气泡,在上端加脱脂棉。取适量粗提取物AWE用去离子水溶解后,慢慢倒入层析柱内。用蒸馏水洗脱后,再依次用50%、70%和90%乙醇洗脱并收集三次乙醇洗脱液,于旋转蒸发仪上脱去大部分溶剂后置于冻干机上冷冻干燥,得到多酚提取物AWF(a polyphenol-enriched fraction

from *Acalypha wilkesiana* leaves), 低温避光保存。

1.4.2 提取物多酚含量的测定

金边桑叶粗提物 AWE 和多酚提取物 AWF 多酚含量的测定参照文献^[7]的方法。将没食子酸标准品配制成不同浓度梯度的标准溶液。取 0.5 mL 不同浓度的没食子酸和样品溶液, 加入 0.5 mL 福林酚试剂置于室温反应 5 min 后加入 0.5 mL 碳酸钠溶液(10%, w/v) 和 3.5 mL 蒸馏水, 混合均匀后, 室温下避光放置 1 h。在 760 nm 处测定吸光值, 重复三次, 经换算后以没食子酸质量为横坐标, 吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线, 并根据标准曲线计算 AWE 和 AWF 多酚含量(即每毫克干燥金边桑叶粗提物或多酚提取物中多酚的微克数: $\mu\text{g GAE}/\text{mg extract}$)。

1.4.3 提取物抗氧化能力的测定

1.4.3.1 DPPH 自由基清除能力的测定

金边桑叶粗提物 AWE 和多酚提取物 AWF 清除 DPPH 自由基的测定参照文献^[7]的方法。取 0.5 mL 不同浓度的 Vc 和样品溶液与 0.5 mL 100 μM DPPH 自由基溶液混合, 混匀后室温避光放置 30 min, 在 517 nm 处测定吸光值 A_1 , 用乙醇代替 DPPH 自由基溶液测定吸光值 A_2 , 以乙醇代替样品溶液, 测定吸光值 A_0 , 根据下列公式计算清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%$$

每个样品重复三次, 以浓度对清除率的平均值作图, 可以得到清除 · DPPH 50% 的样品浓度, 即 IC_{50} 。

1.4.3.2 ABTS 自由基清除能力的测定

金边桑叶粗提物 AWE 和多酚提取物 AWF 清除 ABTS 自由基的测定参照试剂盒所提供的说明书。取 10 μL 不同浓度的 Vc 和样品溶液加入 96 孔板中, 再加入 190 μL ABTS 自由基溶液, 混匀后室温放置 10 min, 在 734 nm 处测定吸光值 A_1 , 用乙醇代替 ABTS 自由基溶液测定吸光值 A_2 , 以乙醇代替样品溶液, 测定吸光值 A_0 , 根据下列公式计算清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%$$

每个样品重复三次, 以浓度对清除率的平均值作图, 可以得到清除 · ABTS 50% 的样品浓度, 即 IC_{50} 。

1.4.4 APAP 诱导急性肝损伤小鼠模型的建立及给药方案

取 C57BL/6 雄性小鼠 40 只, 体重 $20 \pm 2 \text{ g}$, 随机分成 5 组($n=8$): 正常组、模型组、金边桑叶多酚

提取物 AWF 低、中、高剂量组。AWF 各剂量组分别按照低剂量(100 mg/kg · bw)、中剂量(200 mg/kg · bw)和高剂量(400 mg/kg · bw)灌胃给予 AWF, 每日 1 次, 连续给药 7 天, 正常对照组和模型组则给予等体积生理盐水灌胃。小鼠禁食 12 h 后进行末次给药, 2 h 后模型组和 AWF 各剂量组均按照 500 mg/kg · bw 的剂量灌胃 APAP, 正常对照组则给予等体积生理盐水灌胃。6 h 后处死小鼠并取样: 对小鼠进行心脏穿刺取血, 离心(13,500 rpm/min, 10 min)制备血清; 同时收集小鼠肝脏组织, 一部分经 4% 多聚甲醛溶液固定后用于组织病理学分析, 其余部分用液氮冷冻后储存在-80 °C 冰箱用于后续的免疫印迹检测分析。

1.4.5 小鼠各项生化指标的测定

小鼠血清或肝脏组织中 ALT、AST、LDH、SOD、CAT、GSH-Px 和 MDA 活力或含量参照相应试剂盒说明书操作步骤进行。

1.4.6 小鼠肝脏组织病理学观察

小鼠肝脏组织经 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h, 进行常规石蜡包埋切片, 厚度 5 μm , 苏木精-伊红染色, 于显微镜下观察肝脏组织的病理学变化。

1.4.7 免疫印迹法检测蛋白表达

从-80 °C 冰箱取出小鼠肝脏组织, 按比例加入预冷的裂解液后在冰上充分研磨, 离心(13,500 rpm/min, 10 min)收集上清液, 加入上样缓冲液后煮沸变性, 每孔加入 30 μg 蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后用湿转法将蛋白质转印至 PVDF 膜, 5% BSA 封闭 1 h, 加入一抗(稀释比例为 1:1000)在室温下孵育 1 ~ 2 h 或 4 °C 过夜。TBST 缓冲液洗涤 5 次, 每次 3 min, 再加入辣根过氧化酶标记的二抗(稀释比例为 1:5000)在室温下孵育 1 h。TBST 缓冲液洗涤 5 次, 每次 3 min。加入适量 ECL 试剂后, PVDF 膜用 ChemiDoc™ XRS + 化学发光成像系统采集图像并分析结果。

1.4.8 数据处理与分析

用 GraphPad Prism 6 软件进行统计分析处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 用单因素方差分析进行组间统计学分析, $P < 0.05$ 说明差异有统计学意义; 用 Photoshop CS6 软件进行图片处理。

2 结果与分析

2.1 金边桑叶多酚提取物的总多酚含量

按照 1.4.2, 得到没食子酸的拟合回归方程为 Y

$= 0.0544X + 0.108$ ($R^2 = 0.9991$, 1~50 μg), 线性关系良好。根据回归方程计算得金边桑叶粗提物 AWE 和多酚提取物 AWF 多酚含量分别为 224.9 \pm

1.5 和 608.7 \pm 16.4 $\mu\text{g GAE/mg extract}$, 表明经大孔树脂分离纯化后的 AWF 其多酚含量提高了近 3 倍。

表 1 不同金边桑叶提取物多酚含量及对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除能力

Table 1 Polyphenol contents and DPPH and ABTS radical scavenging capacities of different *Acalypha wilkesiana* leaves extracts

| 提取物 Extract | 多酚含量 Polyphenol content ($\mu\text{g GAE/mg extract}$) | $\cdot \text{DPPH IC}_{50}$ ($\mu\text{g/mL}$) | $\cdot \text{ABTS IC}_{50}$ ($\mu\text{g/mL}$) |
|----------------|--|---|---|
| 对照物 Vc | - | 2.87 | 17.23 |
| 金边桑叶粗提取 AWE | 224.9 \pm 1.5 | 13.49 | 141.3 |
| 金边桑叶多酚提取 AWF | 608.7 \pm 16.4 | 4.46 | 41.25 |

2.2 金边桑叶多酚提取物清除 DPPH 和 ABTS 自由基的能力

由图 1 和表 1 可知, 金边桑叶多酚提取物 AWF 对 DPPH 自由基的清除能力高于粗提物 AWE, 且与 Vc 相当, 其 IC_{50} 值分别为 4.46、13.49 和 2.87 $\mu\text{g/mL}$; 类似结果在对 ABTS 自由基的清除能力的检测

中也可以看到, 其 IC_{50} 值分别为 41.25、141.3 和 17.23 $\mu\text{g/mL}$ 。结果表明, 金边桑叶多酚提取物 AWF 具有较强的抗氧化能力, 且与多酚类化合物含量相关。在后续实验中, 我们借助 APAP 诱导的急性肝损伤小鼠模型进一步探讨 AWF 改善氧化应激和对肝损伤小鼠的保护作用及其作用机制。

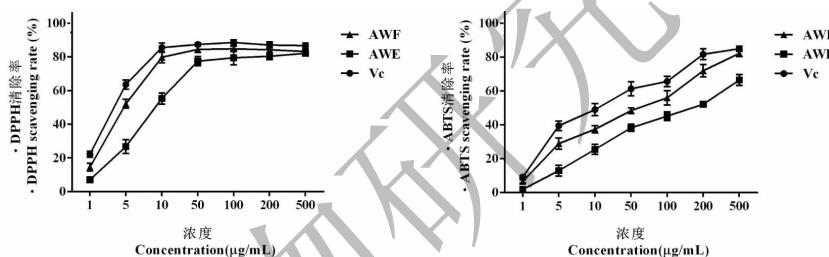


图 1 不同金边桑叶提取物对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除能力

Fig. 1 DPPH and ABTS radical scavenging capacities of different *Acalypha wilkesiana* leaves extracts

2.3 金边桑叶多酚提取物对肝损伤小鼠血清中 ALT、AST 和 LDH 活性的影响

由表 2 可知, 与正常组比较, 模型组小鼠血清中 ALT 和 AST 活性显著升高 ($P < 0.001$), 而与模型组相比, 各剂量 AWF 灌胃处理均能明显抑制小鼠血

清中 ALT 和 AST 活性的升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 且呈现一定的剂量依赖关系, 尤其是高剂量 AWF 的效果最佳 ($P < 0.001$)。结果表明 AWF 对 APAP 诱导的急性肝损伤具有较好的保护作用。

表 2 金边桑叶多酚提取物对 APAP 诱导的肝损伤小鼠血清中 ALT、AST 和 LDH 活性的影响 ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of polyphenols from *Acalypha wilkesiana* leaves on serum activities of ALT, AST, and LDH in mice with APAP-induced liver injury ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 Group | ALT (U/L) | AST (U/L) | LDH (U/L) |
|----------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 正常组 Normal group | 184.73 \pm 7.48 | 163.17 \pm 11.36 | 820.68 \pm 61.84 |
| 模型组 Model group | 943.65 \pm 20.2 * * * | 795.15 \pm 18.77 * * * | 7561.92 \pm 162.64 * * * |
| 低剂量组 Low dose AWF | 789.13 \pm 38.58 ** | 650.67 \pm 24.6 # | 6231.82 \pm 197.25 *** |
| 中剂量组 Middle dose AWF | 582.49 \pm 32.02 ** | 430.56 \pm 27.12 ** | 4467.9 \pm 156.27 *** |
| 高剂量组 High dose AWF | 377.58 \pm 21.66 ** | 303.43 \pm 22.2 ** | 2362.92 \pm 245.35 *** |

注: 与正常组比较, * * * $P < 0.001$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Note: Compared to the normal group, * * * $P < 0.001$; Compared to the model group, # $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

2.4 金边桑叶多酚提取物对肝损伤小鼠肝脏组织形态的影响

由图 2 可知,正常组小鼠肝脏组织无明显病理改变,肝细胞大小形态正常,排列整齐,且细胞结构完整清晰,未见变形和坏死;模型组小鼠肝脏组织结构严重破坏,有明显的局灶性坏死症状,肝中央静脉周围肝细胞肿胀、坏死及炎细胞浸润现象基本消失,尤其高剂量 AWF 对肝损伤的抑制效果最为显著。结果显示 AWF 能减轻 APAP 所致的肝细胞病变,对 APAP 造成的肝毒性具有保护作用。

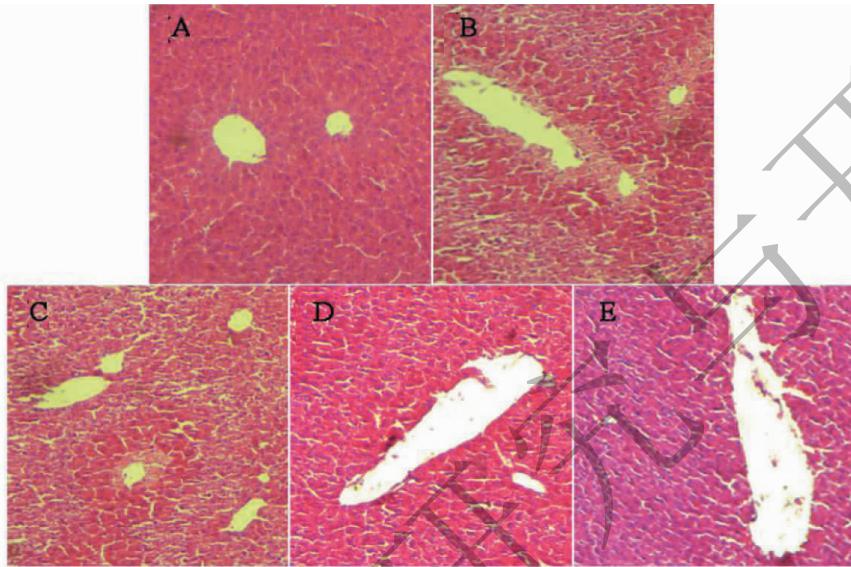


图 2 正常组(A)、模型组(B)、金边桑叶多酚提取物低剂量组(C)、中剂量组(D)和高剂量组(E)中小鼠肝脏组织病理变化(100×)

Fig. 2 Histological changes of mice livers from normal group (A), model group (B), AWF group (low dose) (C), AWF group (middle dose) (D), and AWF group (high dose) (E) (100×)

2.5 金边桑叶多酚提取物对肝损伤小鼠血清或肝脏组织中 SOD、CAT、GSH-Px 和 MDA 的影响

由表 3 可知,模型组小鼠 SOD, CAT 和 GSH-Px 活性较正常组显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),而 MDA 含量明显升高($P < 0.001$);而与模型组相比,各剂量 AWF 灌胃处理均能恢复 SOD, CAT 和 GSH-

Px 活性($P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),并降低 MDA 含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$),且呈现一定的剂量依赖关系,尤其以高剂量 AWF 的改善效果最好($P < 0.001$)。这表明 AWF 对 APAP 诱导的肝损伤的保护作用可能与其抗氧化作用有关。

表 3 金边桑叶多酚提取物对 APAP 诱导的肝损伤小鼠 SOD、CAT、GSH-Px 和 MDA 的影响($n = 8, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of polyphenols from *Acalypha wilkesiana* leaves on the levels of SOD, CAT, GSH-Px, and MDA in mice with APAP-induced liver injury ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

| 组别 Group | SOD (U/mL) | CAT (U/mL) | GSH-Px (U/mg · prot) | MDA (nmol/mL) |
|----------------------|--------------------|-----------------|-------------------------|------------------|
| 正常组 Normal group | 298.18 ± 19.53 | 62.92 ± 6.11 | 286.55 ± 7.53 | 1.55 ± 0.2 |
| 模型组 Model group | 132.72 ± 9.31 *** | 31.72 ± 1.88 ** | 125.24 ± 11.09 *** | 3.18 ± 0.13 *** |
| 低剂量组 Low dose AWF | 154.62 ± 13.78 | 39.62 ± 1.54 ## | 164.67 ± 16.02 # | 2.95 ± 0.31 |
| 中剂量组 Middle dose AWF | 218.79 ± 14.25 ### | 50.04 ± 3.59 ## | 201.09 ± 23.27 ## | 2.32 ± 0.35 # |
| 高剂量组 High dose AWF | 275.53 ± 8.08 ### | 57.06 ± 5.93 ## | 254.96 ± 18.35 ### | 1.77 ± 0.11 ## |

注:与正常组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

Note: Compared to the normal group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Compared to the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

2.6 金边桑叶多酚提取物对肝损伤小鼠肝脏中 MAPKs 和 apoptosis 信号通路的影响

通过上述实验结果可以看到高剂量 AWF 对肝脏的保护作用最好,因此选用高剂量组进行下一步研究。为了进一步探究 AWF 减轻 APAP 致肝损伤的作用机制,我们通过免疫印迹法检测小鼠肝脏组织中 MAPKs 和 apoptosis 通路相关蛋白及其磷酸化水平的改变。由图 3 可知,与正常组比较,模型组小鼠肝脏组织中 p38、JNK 以及 ERK 磷酸化水平明显升高,同时促凋亡蛋白 caspase-3 和 caspase-9 被显著激活,促凋亡蛋白 Bax 蛋白量增加,抗凋亡蛋白 Bcl2 表达量减少;而与模型组相比,高剂量 AWF 可以显著降低 p38、JNK 以及 ERK 磷酸化水平,抑制 caspase-3 和 caspase-9 活化以及 Bax 表达,并上调 Bcl2 蛋白量。结果表明,AWF 对 APAP 致肝损伤小鼠的保护作用可能是通过调控 MAPKs 和 apoptosis 信号通路来实现的。

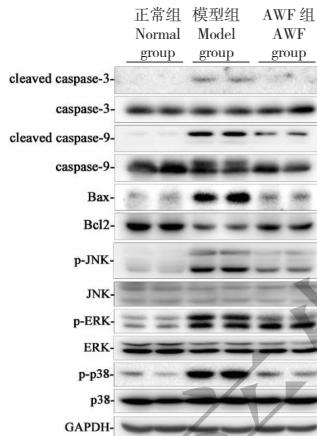


图 3 金边桑叶多酚提取物对肝损伤小鼠肝脏中 MAPKs 和 apoptosis 信号通路的影响

Fig. 3 Effects of polyphenols from *Acalypha wilkesiana* leaves on MAPKs and apoptosis signaling in APAP-intoxicated mice livers

3 结论

肝脏是药物代谢的主要脏器,因而也是药物损伤的主要靶器官。随着药品品种和使用率的不断增加,药源性肝损伤的发生率也逐年升高,因此,肝损伤的防治已成为一个严峻的全球性问题^[13,14]。目前,APAP 诱导的肝损伤小鼠模型已被广泛应用于保肝药物的筛选和评价以及对其作用机制的探索^[3,6,7]。研究表明,自由基堆积引起的氧化应激和线粒体损伤是 APAP 致肝损伤的重要原因,而一些具有较强抗氧化作用的天然活性物已被证明具有防

治药源性肝损伤的功效^[7,9,10,15]。本研究以大孔树脂分离纯化所得金边桑叶多酚提取物 AWF 为研究对象,检测其清除自由基的能力,并借助 APAP 致急性肝损伤小鼠模型进一步探究其抗氧化和肝保护的功效及作用机制。

抗氧化能力与人类健康密切相关,研究表明,体内自由基的大量生成以及抗氧化酶活性的降低等均会导致机体发生氧化性损伤,引起衰老,甚至造成心脑血管病、癌症以及帕金森症等多种疾病,而抗氧化物质的摄入能抵抗自由基等对人体造成的损伤^[16]。多酚类化合物已被证明具有较强的自由基清除能力,是一种天然的抗氧化剂^[6,7,9,16]。本实验体外研究结果表明,金边桑叶多酚提取物 AWF 清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值为 4.46 μg/mL,接近 Vc 的 2.87 μg/mL;AWF 清除 ABTS 自由基的 IC₅₀ 值为 41.25 μg/mL,略高于 Vc 的 17.23 μg/mL。通过数据分析可以得出,AWF 对 DPPH 和 ABTS 自由基具有良好的清除效果,且与多酚类化合物含量呈良好的剂量依赖关系,表明 AWF 有较好的抗氧化能力,并可能与其所含多酚类化合物有关。

血清中 ALT 和 AST 的活性是评价肝脏受损伤程度的灵敏指标,当肝细胞受损时,细胞膜通透性改变,ALT 和 AST 释放进入血液,使血清中两种酶的活性显著上升^[13,17]。本实验体内研究结果表明,金边桑叶多酚提取物 AWF 能有效抑制 APAP 诱导的肝损伤小鼠血清中 ALT 和 AST 活性的升高,并改善组织病理学分析所观察到的肝脏组织变化,表明 AWF 在一定程度上缓解了 APAP 对小鼠肝细胞膜的急性损伤,保护了肝细胞。自由基介导的氧化应激在 APAP 致肝损伤的发生和发展过程中具有重要作用。MDA 是自由基作用于脂质产生的脂质过氧化产物,其含量高低可间接反映机体细胞膜系统的受损程度。SOD、CAT 和 GSH-Px 是机体清除自由基的重要因子,其活性大小可直接反映机体清除自由基的能力^[6-8,13,14]。本研究发现,AWF 能显著降低 APAP 致肝损伤小鼠的 MDA 含量,并升高 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性,这表明 AWF 可能通过抑制脂质过氧化反应,维持体内抗氧化酶活性来清除自由基,进而发挥保护肝脏的作用。

在肝损伤的发生和发展过程中有许多信号通路,包括 MAPKs、NF-κB 以及 Nrf2 在内,都发挥了重要作用^[3,7,18]。有研究指出,在 APAP 致肝损伤过程中由 APAP 代谢诱导生成的 ROS 能直接激活 MAPK 家族成员 JNK,而活化的 JNK 又能进一步刺激促凋

亡蛋白的表达，并抑制抗凋亡蛋白的功能，最终导致严重的肝细胞坏死^[19,20]。从我们的研究结果可以看到，在APAP诱导的肝损伤小鼠肝脏组织中MAPK信号通路被激活，表现为其家族成员p38、JNK以及ERK的磷酸化水平显著提高，同时我们也检测到细胞凋亡相关蛋白表达的改变，包括促凋亡蛋白caspase-3、9的剪切片段和Bax蛋白水平的上调以及抗凋亡蛋白Bcl2蛋白水平的下调。有趣的是，AWF灌胃处理可以有效逆转上述变化，佐证了我们在生化水平及组织病理学分析所得到的结论。上述结果表明，AWF的护肝机制可能是通过抑制MAPKs和apoptosis信号通路的激活，从而减轻APAP诱导的氧化性损伤并抑制肝细胞凋亡。

综上所述，本研究证实了金边桑叶多酚提取物AWF具有很好的抗氧化能力，并能有效改善APAP诱导的小鼠急性肝损伤，而其作用机制可能与介导MAPKs和apoptosis信号通路有关。同时，本研究也为金边桑叶多酚提取物开发成天然抗氧化剂或肝损伤预防与治疗的辅助药物奠定了重要的理论基础。

参考文献

- Rumack BH. Acetaminophen misconceptions [J]. *Hepatology*, 2004, 40:10-15.
- Jadeja RN, Urrunaga NH, Dash S, et al. Withaferin-A reduces acetaminophen-induced liver injury in mice [J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 97:122-132.
- Song E, Fu J, Xia X, et al. Bazhen decoction protects against acetaminophen induced acute liver injury by inhibiting oxidative stress, inflammation and apoptosis in mice [J]. *PLoS One*, 2014, 9:107405.
- Jaeschke H, Knight TR, Bajt ML. The role of oxidative stress and reactive oxygen species in acetaminophen hepatotoxicity [J]. *Toxicol Lett*, 2003, 144:279-288.
- James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity [J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, 31:1499-1506.
- Sun P(孙鹏), Feng X(冯霞), Yi RK(易若琨), et al. Preventive effects of polyphenols from insect tea on acetaminophen-induced hepatic injury in ICR mice [J]. *Food Sci(食品科学)*, 2016, 37:257-264.
- Wu HT, Zhang G, Huang LS, et al. Hepatoprotective effect of polyphenol-enriched fraction from *Folium Microcos* on oxidative stress and apoptosis in acetaminophen-induced liver injury in mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 3631565.
- Tian L, Shi X, Yu L, et al. Chemical composition and hepatoprotective effects of polyphenol-rich extract from *Houttuynia cordata* tea [J]. *J Agric Food Chem*, 60:4641-4648.
- Huang Y(黄雅), Chen HG(陈华国), Zhou X(周欣), et al. Determination of total polyphenols and evaluation of antioxidant activities of *Sambucus chinensis* Lindl. in Guizhou [J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2017, 29: 255-263.
- Malejko J, Nalewajko-Sieliwoniuk E, Nazaruk J, et al. Determination of the total polyphenolic content in *Cirsium palustre* (L.) leaves extracts with manganese (IV) chemiluminescence detection [J]. *Food Chem*, 2014, 152:155-161.
- Owoyele BV, Okoye OC, Dolor RO, et al. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effects of the ethanol extract of *Acalypha wilkesiana* leaves in rats [J]. *Nig J Physiol Sci*, 2011, 26:77-82.
- Olukunle JO, Adenubi OT, Biobaku KT, et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of methanol extract and fractions of *Acalypha wilkesiana* leaves [J]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2015, 26:181-184.
- Yang ZG(杨志刚), Pan LY(潘龙银), Wang XR(王心睿). Protective effect of phytosterol from *Momordica charantia* on paracetamol-induced hepatic damage in mice [J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2015, 27:2031-2034.
- Zhang Z(张真), Fu Y(扶艳), Liang XF(梁信芳), et al. Protective effect of astaxanthin on paracetamol-induced hepatic damage in mice [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志)*, 2010, 29:433-436.
- Zhang ZJ(张占军), Wang FH(王富花), Zeng XX(曾晓雄). *In vitro* antioxidant activities and hepatoprotective effects of polysaccharides from *Allium macrostemon* bunge [J]. *Mod Food Sci Technol(现代食品科技)*, 2014, 30:1-6.
- Liu M(柳梅), Ren X(任璇), Yao YJ(姚玉军), et al. Antioxidant and *in vitro* hypoglycemic activities of polyphenol in sea buckthorn leaves [J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2017, 29:1013-1019.
- Wang N(王楠), Du SK(杜双奎), Feng XC(冯宪超), et al. Protective effect of lactic acid-fermented beverage prepared from the peduncles of *Hovenia dulcis* on alcohol-induced liver damage in mice [J]. *Mod Food Sci Technol(现代食品科技)*, 2016, 32:28-41.
- Chan K, Han XD, Kan YW. An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98:4611-4616.
- Gunawan BK, Liu ZX, Han D, et al. c-Jun N-terminal kinase plays a major role in murine acetaminophen hepatotoxicity [J]. *Gastroenterology*, 2006, 131:165-178.
- Latchoumycandane C, Goh CW, Ong MM, et al. Mitochondrial protection by the JNK inhibitor leflunomide rescues mice from acetaminophen-induced liver injury [J]. *Hepatology*, 2007, 45:412-421.