

# 荷叶总生物碱激活肝脏 AMPK/Nrf2 通路缓解对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤

舒广文,邱韵涵,李薇,付千,谌业珺,邓旭坤\*

中南民族大学药学院 民族药学国家级实验教学示范中心,武汉 430074

**摘要:**为探讨荷叶总生物碱(TAL)对乙酰氨基酚(APAP)所致小鼠急性肝损伤的保护作用及可能机制,小鼠被随机分为正常组,模型组和TAL低、高剂量组(30、100 mg/kg),连续灌胃给药七天后,除正常组外,其余各组腹腔注射300 mg/kg的APAP诱导急性肝损伤。12小时后,收集各组小鼠的血清与肝脏样本,进行后续实验。结果显示,与模型组相比,TAL可显著降低血清中的ALT和AST活性,下调肝组织中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6和MDA含量,上调肝组织中SOD、CAT、GSH-Px和GSH的水平。此外,TAL还明显改善了APAP诱导的小鼠肝组织病变。在TAL的作用下,肝内AMPK磷酸化水平提高,Nrf2蛋白入核,HO-1和GCLC基因表达上调。综上所述,TAL对APAP诱导的急性肝损伤具有保护作用,其机制可能与激活AMPK/Nrf2通路相关。

**关键词:**荷叶总碱;肝损伤;抗氧化;Nrf2通路

中图分类号:R285;R965

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)2-0198-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.2.003

## Protective effects of total alkaloids from lotus leaf on acetaminophen-induced acute liver injury in mice: roles of activating hepatic AMPK/Nrf2 signaling

SHU Guang-wen, QIU Yun-han, LI Wei, FU Qian, SHEN Ye-jun, DENG Xu-kun\*

*National Demonstration Center for Experimental Ethnopharmacology Education, School of Pharmaceutical Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China*

**Abstract:** This study aimed to understand the protective effects of total alkaloids from lotus leaves (TAL) on acute liver injury induced by acetaminophen (APAP) in mice and the potential mechanisms. Mice were randomly divided into 4 groups, i. e., the normal group, the model group, the TAL low-dosage group (30 mg/kg) and the TAL high-dosage group (100 mg/kg). Animals received TAL through gavage for 7 consecutive days. Then, except the normal group, other groups received APAP (300 mg/kg) by intraperitoneal injection to provoke acute liver injury. Serum and livers of mice were collected 12 h later and subjected to further experiments. Our results showed that as compared to the model group, TAL significantly decreased activities of ALT and AST in the serum and contents of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and MDA in the liver. In addition, TAL dose-dependently elevated hepatic levels of SOD, CAT, GSH-Px and GSH. Moreover, APAP-induced liver histopathological changes were dramatically alleviated by TAL. Mechanistically, TAL considerably boosted AMPK phosphorylation, induced nuclear translocation of Nrf2 and promoted expression of HO-1 and GCLC. In conclusion, this study revealed that TAL has the capacity of ameliorating APAP-induced acute liver injury, and the underlying mechanisms are related with the activation of hepatic AMPK/Nrf2 cascade.

**Key words:** total alkaloids from lotus leaves; liver injury; antioxidant; Nrf2 pathway

对乙酰氨基酚(Acetaminophen, APAP)是一种广泛使用的解热镇痛药<sup>[1]</sup>。但是,在摄入过量时,

APAP可诱发肝脏氧化应激,从而引起严重的肝损伤,并可进一步恶化为致命的肝衰竭<sup>[2]</sup>。目前,临床上主要采取抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸来应对APAP诱导的肝损伤。但是,其治疗效果并不十分令人满意<sup>[3]</sup>。因此,寻找潜在的能够缓解APAP所致肝损伤的新药具有十分重要的意义。

收稿日期:2018-08-28 接受日期:2018-12-28

基金项目:湖北省自然科学基金一般面上项目(2018CFB624)

\*通信作者 Tel:86-013407100639; E-mail:dengxukun@mail.scuec.edu.cn

Nrf2 (NF-E2-related factor-2) 是一个广泛表达于高等动物各个组织内的转录因子, 它可与其下游基因启动子区域内的特定顺式作用原件——抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 直接结合并启动基因的转录<sup>[4]</sup>。对 Nrf2 蛋白亚细胞定位的调节是 Nrf2 通路活性调控的经典方式。在细胞不受任何刺激的状态下, Nrf2 蛋白将与其抑制因子 Keap1 蛋白结合而定位于细胞质基质中<sup>[5]</sup>。这时, Nrf2 不能发挥其转录激活作用。当细胞内发生氧化应激时, Keap1 的构象发生改变。这时, Keap1 与 Nrf2 的结合能力降低, Nrf2 可从 Keap1 上释放出来, 进入细胞核并启动其下游基因的转录<sup>[6]</sup>。典型的受 Nrf2 控制的下游基因包括血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 和谷氨酸半胱氨酸连接酶催化亚基 (catalytic subunit of glutamate cysteine ligase, GCLC) 等抗氧化酶的编码基因。这些基因的表达产物能够对抗环境中或者内源性的各种毒性物质诱导的细胞内氧化应激。研究表明, 增强 Nrf2 通路活性可明显缓解 APAP 诱导的肝损伤<sup>[7]</sup>。因此, 靶向性激活 Nrf2 通路可作为干预 APAP 所致肝损伤的潜在策略。

很多植物来源的天然产物对毒物诱导的肝损伤都有较好的干预作用<sup>[8,9]</sup>。荷叶是睡莲科植物莲的干燥叶, 含黄酮、生物碱、皂苷等多种化学成分, 药理活性广泛<sup>[10]</sup>。研究表明, 荷叶中的生物碱类化合物具有良好的抗氧化作用<sup>[11]</sup>。然而, 目前尚不清楚荷叶总生物碱 (total alkaloids from lotus leaves, TAL) 是否可以缓解 APAP 所致的急性肝损伤。因此, 本实验探讨了 TAL 对 APAP 所致小鼠急性肝损伤的保护作用和可能的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

动物: 雄性 8 周龄昆明小鼠, 体重 20 ~ 25 g, 由湖北省实验动物研究中心提供。实验动物生产许可证号: SCXX (鄂) 2015-0018。

主要试剂与试剂盒: APAP (批号 B19M8E36136, 质量分数 > 98%), 购自上海源叶生物科技有限公司; 识别 NF-E2-related factor-2 (Nrf2)、Lamin B、heme oxygenase-1 (HO-1)、catalytic subunit of glutamate-cysteine ligase (GCLC) 和  $\beta$ -actin 蛋白的一抗和酶标二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司; 识别 AMPK $\alpha$  ( $\alpha$  subunit of AMP-activated pro-

tein kinase) 和 172 位苏氨酸磷酸化的 AMPK $\alpha$  的一抗购自碧云天生物技术有限公司。ALT、AST、MDA、GSH、SOD、CAT、GSH-Px 试剂盒购自南京建成生物工程研究所; TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的 ELISA 检测试剂盒购自南京建成生物技术研究。细胞核提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

主要仪器: THERMO Multiskan GO 酶标仪, 美国 Thermo Scientific 公司; 7300 荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 TAL 的制备

TAL 的制备参照已有文献<sup>[12]</sup>。取干燥的荷叶 (100 g), 粉碎过筛, 以 30 倍体积的 0.2% HCl 为溶剂进行提取, 提取 3 次, 每次持续 3 h。合并提取液, 过滤, 将滤液浓缩至一定体积后过 D001 阳离子交换树脂柱。然后, 先以 5 倍柱体积的纯化水洗涤去除杂质, 再以含 1% 氨水的 95% 乙醇溶液洗脱。将洗脱液浓缩蒸干, 即得 TAL (0.92 g)。

#### 1.2.2 动物分组与造模

在参考过相关文献<sup>[13,14]</sup> 并进行预实验之后, 我们选择 30 和 100 mg/kg 作为 TAL 的给药剂量来开展本文的研究。40 只雄性昆明小鼠随机分为 4 组, 即正常组、模型组、TAL 低剂量组 (30 mg/kg) 和 TAL 高剂量组 (100 mg/kg), 每组 10 只。灌胃给药每日 1 次, 持续 7 日。末次给药 2 h 后, 腹腔注射 APAP (300 mg/kg) 制备急性肝损伤模型<sup>[15]</sup>, 12 h 后, 开始后续实验。

#### 1.2.3 样本制备与相关生理生化指标测定

麻醉小鼠, 取血, 分离血清, 检测血清中 ALT 和 AST 水平。脱颈椎处死小鼠, 剖取肝脏, 取小鼠肝右叶组织置于 10% 缓冲福尔马林中保存, 进行苏木素-伊红染色, 观察肝脏组织病理变化。另取一部分肝组织按 1:9 比例加入冰生理盐水, 匀浆、离心, 制备肝匀浆, 检测肝组织中 MDA、GSH 含量以及抗氧化酶 SOD、CAT、GSH-Px 活力, ELISA 法检测肝组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的含量。所有实验操作均按照试剂盒说明书进行。

#### 1.2.4 肝脏细胞核抽提物的制备

按照试剂盒说明书规定的实验步骤操作, 制备小鼠肝脏组织细胞核的抽提物。

#### 1.2.5 免疫印迹

首先, 用 SDS-PAGE 电泳法分离蛋白质样本 (每

泳道上样 25  $\mu\text{g}$  蛋白)。电泳结束后,将胶中的蛋白转印到 PVDF 膜上。然后,用 5% 脱脂奶粉封闭膜。将膜依次与相应的一抗(1:1 000 稀释)和酶标二抗(1:1 000 稀释)孵育。最后,用 ECL 化学发光底物进行发光显影,用 Image J 软件对所得图像进行蛋白质条带的半定量分析。

### 1.2.6 定量 PCR

用 Trizol 提取肝脏组织 RNA。取 5  $\mu\text{g}$  总 RNA,用 cDNA 第一链合成试剂盒将 RNA 反转录成为 cDNA。以 GAPDH 基因为内参,用荧光定量 PCR 对 HO-1 和 GCLC 的转录水平进行量化分析。引物序列如下(5'至 3')。小鼠 HO-1(正向):AGG TAC ACA TCC AAG CCG AGA;小鼠 HO-1(反向):CAG TGA GGC CCA TAC CAG AAG。小鼠 GCLC(正向):CTA CCA CGC AGT CAA GGA CC;小鼠 GCLC(反向):CCT CCA TTC AGT AAC AAC TGG AC。小鼠 GAPDH(正向):AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG;小鼠 GAPDH(反向):CTT CCC ATT CTC GGC

CTT G。

PCR 反应结束后,以 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,三磷酸甘油醛脱氢酶)为内参,计算各个基因的相对表达水平<sup>[16]</sup>。

### 1.3 统计学分析

所有实验数据均以平均数  $\pm$  标准差表示。采用软件 SPSS 对实验数据进行统计分析,当  $P < 0.05$  时,可认为差异具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 TAL 对 APAP 肝损伤小鼠肝脏指数及血清 ALT、AST 水平的影响

与正常组相比,模型组小鼠出现肝脏肿大,肝脏指数显著上升( $P < 0.01$ )。给予不同剂量的 TAL 后,肝脏指数均显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。模型组小鼠血清中 ALT 和 AST 水平明显高于正常组( $P < 0.01$ )。TAL 剂量依赖性地降低了肝损伤小鼠血清中的 ALT 和 AST 水平( $P < 0.01$ )。

表 1 TAL 对小鼠肝脏指数及血清中 ALT、AST 水平的影响( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effects of TAL on mouse liver index and serum levels of ALT and AST ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	Liver index (%)	ALT (U/L)	AST (U/L)
正常 Normal	-	4.58 $\pm$ 0.52	64.2 $\pm$ 11.3	29.7 $\pm$ 10.2
模型 Model	-	6.59 $\pm$ 0.86 <sup>##</sup>	366.7 $\pm$ 25.7 <sup>##</sup>	218.6 $\pm$ 40.3 <sup>##</sup>
TAL 低剂量 TAL-L	30	5.84 $\pm$ 0.63 <sup>*</sup>	238.8 $\pm$ 24.8 <sup>**</sup>	105.9 $\pm$ 23.7 <sup>**</sup>
TAL 高剂量 TAL-H	100	4.96 $\pm$ 0.43 <sup>**</sup>	111.9 $\pm$ 16.9 <sup>**</sup>	42.1 $\pm$ 8.9 <sup>**</sup>

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

Note:Compared with normal group,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;Compared with model group,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

### 2.2 TAL 对 APAP 肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响

如图 1 所示,与正常组相比,模型组小鼠的肝脏可见明显组织病理学变化,包括组织细胞排列不整

齐,部分肝细胞细胞核缺失,组织内出血以及炎性细胞浸润。TAL 有效地缓解了 APAP 诱导的这些组织病理学变化。

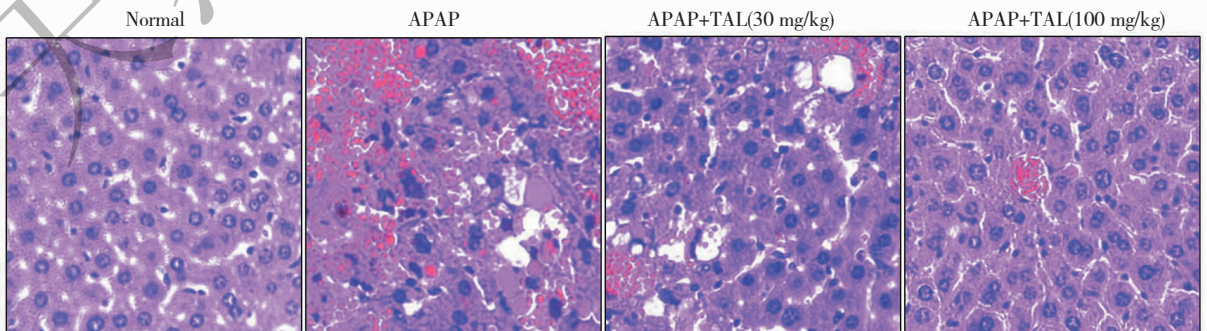


图 1 TAL 对小鼠肝组织形态学的影响(400  $\times$ )

Fig. 1 Effects of TAL on the morphology of mouse liver tissues (400  $\times$ )

### 2.3 TAL 对 APAP 肝损伤小鼠肝组织中 MDA 与 GSH 含量的影响

如下表所示,模型组小鼠肝组织中 MDA 含量较正常组有明显升高 ( $P < 0.01$ )。经 TAL 处理

后,小鼠肝组织中 MDA 含量显著下降 ( $P < 0.01$ )。与正常组相比,模型组小鼠肝组织中 GSH 含量显著降低 ( $P < 0.01$ )。TAL 低、高剂量组 GSH 含量则有显著升高 ( $P < 0.01$ )。

表 2 TAL 对肝组织中的 MDA 与 GSH 含量的影响 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effects of TAL on hepatic contents of MDA and GSH ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	MDA (nmol/mg protein)	GSH ( $\mu\text{M/g tissue}$ )
正常 Normal	-	0.45 $\pm$ 0.04	6.1 $\pm$ 0.4
模型 Model	-	1.16 $\pm$ 0.12 <sup>##</sup>	4.3 $\pm$ 0.5 <sup>##</sup>
TAL 低剂量 TAL-L	30	0.85 $\pm$ 0.08 <sup>**</sup>	5.1 $\pm$ 0.6 <sup>**</sup>
TAL 高剂量 TAL-H	100	0.49 $\pm$ 0.06 <sup>**</sup>	5.5 $\pm$ 0.7 <sup>**</sup>

注:与正常组比较,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note:Compared with normal group,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;Compared with model group,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

### 2.4 TAL 对 APAP 肝损伤小鼠肝组织中 SOD、CAT 和 GSH-Px 活力的影响

经 APAP 处理后,小鼠肝组织中抗氧化酶 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活力显著降低 ( $P < 0.01$ )。与

模型组相比,TAL 剂量依赖性地增强了小鼠肝组织中 SOD、CAT 和 GSH-Px 等抗氧化酶的活力 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

表 3 TAL 对肝组织中 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性的影响 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effects of TAL on hepatic activities of SOD,CAT and GSH-Px ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	SOD (U/mg protein)	CAT (U/mg protein)	GSH-Px (U/mg protein)
正常 Normal	-	404.2 $\pm$ 34.9	24.8 $\pm$ 2.5	804.2 $\pm$ 78.5
模型 Model	-	318.4 $\pm$ 32.6 <sup>##</sup>	9.2 $\pm$ 3.8 <sup>##</sup>	649.7 $\pm$ 55.7 <sup>##</sup>
TAL 低剂量 TAL-L	30	363.3 $\pm$ 35.9 <sup>*</sup>	14.5 $\pm$ 2.5 <sup>**</sup>	745.6 $\pm$ 61.7 <sup>*</sup>
TAL 高剂量 TAL-H	100	397.6 $\pm$ 33.1 <sup>**</sup>	22.2 $\pm$ 2.1 <sup>**</sup>	792.7 $\pm$ 77.9 <sup>**</sup>

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

Note:Compared with normal group,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;Compared with model group,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

### 2.5 TAL 对 APAP 肝损伤小鼠肝组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和 IL-6 含量的影响

TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 是典型的炎症因子。在模

型组小鼠肝组织中,这三个细胞因子的含量均显著上升 ( $P < 0.01$ )。TAL 剂量依赖性地下调了小鼠肝脏中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的含量 ( $P < 0.01$ )。

表 4 TAL 对肝组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 含量的影响 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 4 Effects of TAL on hepatic levels of TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$  and IL-6 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	TNF- $\alpha$ (pg/mg tissue)	IL-1 $\beta$ (pg/mg tissue)	IL-6 (pg/mg tissue)
正常 Normal	-	43.8 $\pm$ 3.7	10.5 $\pm$ 1.1	91.6 $\pm$ 11.1
模型 Model	-	210.6 $\pm$ 20.2 <sup>##</sup>	39.5 $\pm$ 3.2 <sup>##</sup>	417.9 $\pm$ 38.5 <sup>##</sup>
TAL 低剂量 TAL-L	30	115.9 $\pm$ 9.2 <sup>**</sup>	29.4 $\pm$ 2.3 <sup>**</sup>	264.7 $\pm$ 19.5 <sup>**</sup>
TAL 高剂量 TAL-H	100	57.6 $\pm$ 8.9 <sup>**</sup>	11.6 $\pm$ 1.2 <sup>**</sup>	120.6 $\pm$ 16.7 <sup>**</sup>

注:与正常组比较,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note:Compared with normal group,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;Compared with model group,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

### 2.6 TAL 对小鼠肝脏中 AMPK/Nrf2 途径的影响

如图 2A 所示,与正常小鼠相比,模型小鼠肝脏细胞核内的 Nrf2 蛋白量呈现增加的趋势。TAL 则

进一步剂量依赖性地上调了 Nrf2 蛋白在模型小鼠肝脏细胞核中的含量 ( $P < 0.01$ )。AMPK 是 Nrf2 的重要调控因子之一。如图 2B 所示,APAP 对小鼠

肝脏中 AMPK $\alpha$  的磷酸化水平无明显影响。在 TAL 的作用下,小鼠肝脏中 AMPK $\alpha$  的磷酸化水平明显

提高( $P < 0.01$ )。

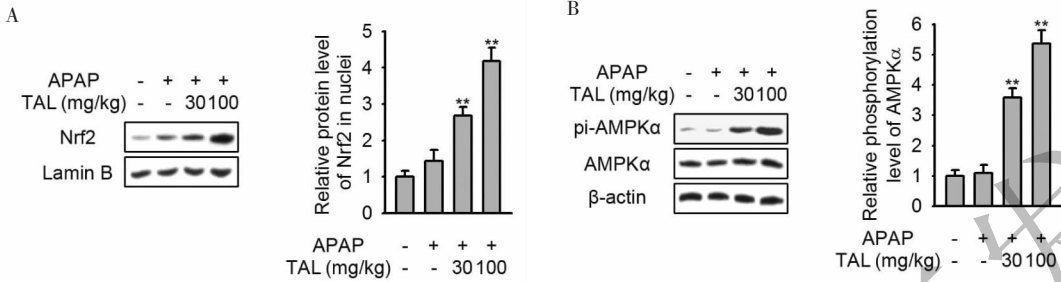


图2 TAL 激活模型小鼠肝脏中的 AMPK/Nrf2 通路

Fig. 2 TAL activated the AMPK/Nrf2 cascade in the liver of mice

## 2.7 TAL 对小鼠肝脏中 Nrf2 下游基因表达水平的影响

实验结果如图 3A 和 3B 所示。HO-1 和 GCLC 都是典型的 Nrf2 下游基因。与正常小鼠相比,模型

小鼠肝脏中这两个基因的表达水平有上升趋势。与模型小鼠相比,TAL 可以在 mRNA 和蛋白质水平明显上调 HO-1 和 GCLC 的表达( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

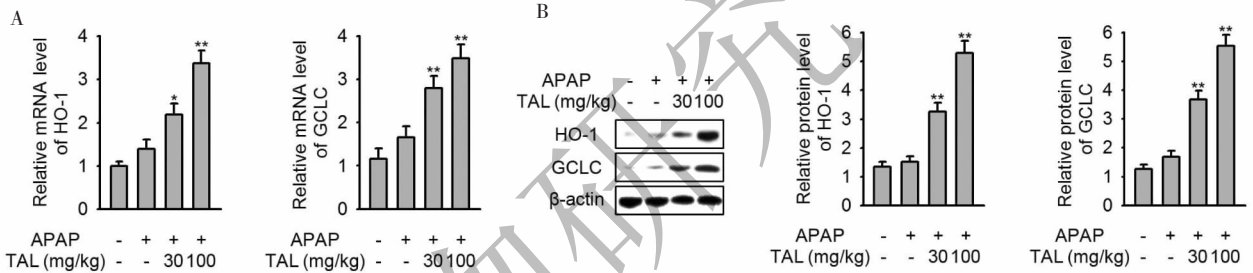


图3 TAL 上调模型小鼠肝脏中 Nrf2 下游基因的表达

Fig. 3 TAL elevated the expression of Nrf2-responsive genes in the liver of mice

## 3 讨论

肝细胞受损时,动物血清中的 ALT 和 AST 水平将显著升高。与正常组相比,模型组小鼠血清中的 ALT 和 AST 活性均有大幅升高,提示 APAP 诱导了显著的肝损伤。TAL 有效降低了血清中这些酶的活性。这提示 TAL 对于 APAP 诱导的肝损伤具有明显的缓解作用。与此一致的是,TAL 可明显改善 APAP 诱导的小鼠肝组织病变。

过量的 APAP 会大量消耗 GSH,降低肝细胞的抗氧化能力,从而引起胞内脂质过氧化,MDA 含量上升<sup>[17]</sup>。施用 TAL 能显著提高肝损伤小鼠肝组织中的 GSH 水平,抑制 MDA 生成。APAP 过量时,肝脏中发生氧化应激反应,导致抗氧化酶 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性降低。与模型组相比较,TAL 各剂量组小鼠 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性均有上升。表明 TAL 可上调抗氧化酶的活性,提高机体的抗氧化能力。在 APAP 的作用下,肝脏中炎症因子 TNF-

$\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的水平会明显升高。炎症因子的积聚进一步加剧了 APAP 诱导的肝损伤<sup>[18]</sup>。在本研究中,TAL 可显著下调模型小鼠肝组织中炎症因子的含量,抑制炎症反应的发生。以上研究结果综合说明,TAL 能显著缓解 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤。

AMPK 是一个由三条肽链组成的丝/苏氨酸蛋白激酶。AMPK $\alpha$  是 AMPK 的催化亚基。AMPK $\beta$  和 AMPK $\gamma$  是 AMPK 的调节亚基。细胞内 AMP 水平增加时,AMPK 由低活性的形式转变为高活性的形式,从而启动其下游分子事件。AMPK $\alpha$  上 172 位苏氨酸残基的磷酸化是 AMPK 被激活的重要标志。AMPK 可通过以下三方面机制对 Nrf2 通路起到正向调控作用。其一,AMPK 可直接催化 Nrf2 蛋白中 550 位丝氨酸残基的磷酸化而促进 Nrf2 的细胞核转位<sup>[19]</sup>。其二,活化的蛋白激酶 GSK-3 $\beta$  可以通过诱导 Nrf2 出细胞核而终止 Nrf2 介导的基因转录。

AMPK 可通过催化 GSK-3 $\beta$  上第 9 位丝氨酸的磷酸化而抑制 GSK-3 $\beta$  的活性, 从而拮抗 GSK-3 $\beta$  对 Nrf2 的抑制作用<sup>[20]</sup>。其三, p62 是一个磷酸化依赖的 Nrf2 活化因子。磷酸化的 p62 蛋白可通过与 Nrf2 蛋白相互作用而促进 Nrf2 的细胞核转位<sup>[21]</sup>。AMPK 则可直接催化 p62 蛋白的磷酸化, 从而有利于 Nrf2 通路的激活<sup>[22]</sup>。在 APAP 的作用下, 肝脏内的氧化应激有代偿性上调肝内 Nrf2 通路活性的趋势。但是, 这种对 Nrf2 的激活作用较弱, 不呈现统计学意义, 也不足以消除 APAP 诱导的氧化应激<sup>[23]</sup>。与模型小鼠组相比, TAL 能明显促进 Nrf2 蛋白向细胞核内聚集并诱导 Nrf2 下游基因 HO-1 和 GCLC 的表达。这些研究结果提示 TAL 对于小鼠肝脏中的 Nrf2 通路具有明显的激活作用。另一方面, TAL 能明显诱导小鼠肝脏内 AMPK $\alpha$  的磷酸化。这提示提高 AMPK 的活性在 TAL 激活肝脏 Nrf2 通路的过程中可能起到了关键性作用。与我们的结果类似的是, 小分子化合物 dioscin 和 esculentoside A 等亦可通过作用于 AMPK/Nrf2 通路来诱导 HO-1 和 GCLC 的高表达, 以此缓解硫代乙酰胺和 APAP 诱导的肝损伤<sup>[24,25]</sup>。以上研究结果进一步提示, 激活 AMPK/Nrf2 通路可能可以作为利用小分子化合物来干预毒物所致肝损伤的一种可行策略。

#### 参考文献

- 1 Yang ZG, Pan LY, Wang XR. 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.
- 2 Karthivashan G, Arulselvan P, Tan SW, et al. The molecular mechanism underlying the hepatoprotective potential of Moringa oleifera, leaves extract against acetaminophen induced hepatotoxicity in mice[J]. J Funct Foods, 2015, 17: 115-126.
- 3 Wu H, Zhang G, Huang L, 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, 4: 3631565.
- 4 Lv H, Xiao Q, Zhou J, et al. Licochalcone A upregulates Nrf2 antioxidant pathway and thereby alleviates acetaminophen-induced hepatotoxicity[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 147.
- 5 Hu LF, Wang Y, Ren RJ, et al. Anti-oxidative stress actions and regulation mechanisms of Keap1-Nrf2/ARE signal pathway[J]. J Int Pharm Res(国际药学研究杂志), 2016, 43: 146-152.
- 6 Huang W, Wang Y, Jiang X, et al. Protective effect of flavonoids from *Ziziphus jujuba cv. Jinsixiaozao* against acetaminophen-induced liver injury by inhibiting oxidative stress and inflammation in mice[J]. Molecules, 2017, 22: 3887-3893.
- 7 Kouam AF, Yuan F, Njyou FN, et al. Induction of Mkp-1 and nuclear translocation of Nrf2 by limonoids from khaya grandifoliola C. DC protect L-02 hepatocytes against acetaminophen-induced hepatotoxicity[J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 653.
- 8 Xia N, Chen YL, Tao HY, et al. Protective effect of polysaccharides from *Morus nigra* Linn. fruits on CCl<sub>4</sub>-induced liver damage in rats[J]. Food Sci(食品科学), 2015, 36: 247-251.
- 9 Xin Z, Deng Q, Chen H, et al. Characterizations and hepatoprotective effect of polysaccharides from Mori Fructus, in rats with alcoholic-induced liver injury[J]. Int J Biol Macromol, 2017, 102: 60-67.
- 10 Liu BT. The chemical composition and pharmacological effects of nelumbo nucifera leaves[J]. Contemp Chem Ind(当代化工研究), 2016, 7: 134-135.
- 11 Xiao GQ, Tian Y, Lu XY. Study on scavenging oxygen free radicals capabilities of total alkaloids from lotus leaves[J]. Chem & Bioeng(化学与生物工程), 2011, 28(10): 35-38.
- 12 He XX. Study on analysis and pharmacokinetics of alkaloids from nelumbo nucifera leaves[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology(天津科技大学), 2013.
- 13 Zhang L, Hao J, Huang X, et al. Total alkaloids from the seed embryo of nelumbo nucifera ameliorate inflammation in the livers of mice with lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver failure[J]. Food Sci(食品科学), 2018, 39: 220-225.
- 14 Zhou JG. Study of hepatoprotective effect of the total alkaloids from *Corydalis saxicola* bunting of the acute chemical hepatic injury model mice[J]. Chin Modern Med(中国当代医药), 2010, 17(27): 29-30.
- 15 Truong VL, Bak MJ, Jun M, et al. Antioxidant defense and hepatoprotection by procyanidins from almond(*Prunus amygdalus*) skins[J]. J Agric Food Chem, 2014, 62: 8668.
- 16 Yan H, Huang Z, Bai Q, et al. Natural product andrographolide alleviated APAP-induced liver fibrosis by activating Nrf2 antioxidant pathway[J]. Toxicology, 2018, 396-397: 1-12.
- 17 Lin LC, Zhao FF, Wang M, et al. Protection of auriculatone sulphate against APAP-induced acute liver injury in mice[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30: 761-766.