

基于 JNK 通路研究老鹳草素对免疫性肝损伤小鼠的影响

李家妮, 韩佳佳, 程瑞华, 赵唐莲, 张可锋, 饶聰矛, 吴卫*, 高雅*

桂林医学院药学院, 桂林 5410041

摘要:为探讨老鹳草素对脂多糖(LPS)所致小鼠免疫性肝损伤的保护作用及可能机制,60只小鼠被随机分为正常组、模型组、水飞蓟素组(180 mg/kg)和老鹳草素低、中、高剂量组(50、100、200 mg/kg),小鼠腹腔注射10 mg/kg的LPS诱导免疫性肝损伤。采取HE染色观察小鼠肝细胞病理改变情况;生化法检测血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)活性、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)水平,血清中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性和丙二醛(MDA)含量;酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测肝组织中炎症因子白介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-6(IL-6)的含量;蛋白免疫印迹实验(Western blot)法检测小鼠肝组织中p-ASK1、ASK1、MKK4、p-MKK4、JNK、p-JNK、c-Jun和p-c-Jun的表达水平。结果表明,老鹳草素各剂量组和水飞蓟素组小鼠肝组织炎症坏死和凋亡现象有不同程度的减轻。与模型组相比,老鹳草素各剂量组可显著降低血清中的ALT、AST、ALP、TBIL、MDA和肝组织中IL-1 β 、TNF- α 和IL-6水平,上调血清中SOD和GSH-Px的水平,并且抑制肝组织中p-ASK1、p-MKK4、p-JNK、p-c-Jun的表达。综上所述,老鹳草素对LPS诱导的免疫性肝损伤具有保护作用,其机制可能与抑制JNK通路相关。

关键词:老鹳草素;免疫性肝损;脂多糖;保肝;JNK信号通路

中图分类号:R965.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)4-0563-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.4.004

Study on the effect of geraniin on immunological liver injury in mice based on JNK pathway

LI Jia-ni, HAN Jia-jia, CHENG Rui-hua, ZHAO Tang-lian, ZHANG Ke-feng, RAO Cong-mao, WU Wei*, GAO Ya*

College of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541004, China

Abstract: In order to explore the protective effect and possible mechanism of geraniin on immune liver injury induced by lipopolysaccharide (LPS) in mice, 60 mice were randomly divided into normal group, model group and silymarin group (180 mg/kg) and geraniin low, medium and high dose groups (50, 100, 200 mg/kg). Mice were injected intraperitoneally with 10 mg/kg of LPS to induce immune liver injury. HE staining were used to observe the pathological changes of the livers; biochemical methods were used to detect serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) activities, alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin (TBIL) levels, and serum superoxide biochemical dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) activity and malondialdehyde (MDA) content; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for detection of interleukin-1 β (IL-1 β) in liver tissue, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) content; Western blot method was used to detect p-ASK1, ASK1, MKK4, p-MKK4, JNK, p-JNK, c-Jun and p-c-Jun expression levels. The results showed that the inflammation, necrosis and apoptosis of the liver tissues of the mice in the geraniin group and the silymarin group were reduced to varying degrees. Compared with the model group, each dose group of geraniin can significantly reduce serum ALT, AST, ALP, TBIL, MDA and liver tissue IL-1 β , TNF- α and IL-6 levels, up-regulate serum SOD and GSH-Px and inhibit the expression of p-ASK1, p-MKK4, p-JNK, p-c-Jun in liver tissue. In summary, geraniin has a protective effect on LPS-induced immune liver injury, and its mechanism may be related to the inhibition of the JNK pathway.

Key words: geraniin; immune liver damage; lipopolysaccharide; liver protection; JNK signaling pathway

收稿日期:2020-09-07 接受日期:2021-01-05

基金项目:广西壮族自治区教育厅八桂学者专项(桂财教函[2017]143号);国家自然科学基金(81760704)

*通信作者 E-mail: wuwei_2007@126.com, xueshengcailiao@163.com

免疫性肝损伤是由免疫应答介导的,常伴随炎性细胞浸润、肝细胞索结构破坏^[1]。并且,该损伤是肝纤维化、肝硬化乃至肝脏肿瘤等终末病变发生发展的必经之路,决定了疾病的转归与恶化^[2]。最近,免疫性肝损伤在我国的发病率呈现逐年递增趋势,临幊上大多采用免疫抑制剂,但治疗效果并不明显,停药后易复发^[3]。因此,寻求防治免疫性肝损伤的行之有效的药物迫在眉睫。老鹳草为牻牛儿苗科老鹳草属,主产于我国东北、华北等几个地区以及某些亚洲国家^[4]。老鹳草素(geraniin)主要从老鹳草中分离得到,具有抗氧化、抗炎等多种作用^[4,5]。有研究表明,老鹳草素减少了由 H₂O₂诱导的促凋亡蛋白 Bax 的表达,促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,但并未对相关凋亡通路进行深入研究^[6]。此外,Wu 等^[7]研究表明,老鹳草素和可乐宁联合使用能显著减弱脂多糖(LPS)刺激的 RAW 264.7 巨噬细胞和对乙酰氨基酚(APAP)诱导的小鼠免疫性肝损伤。目前,我们尚未发现有相关文献对老鹳草素基于 JNK 通路对免疫性肝损伤的作用进行报道。因此,本实验在 Wu 等^[7]和本课题组已证实老鹳草素对 D-氨基半乳糖^[4]和四氯化碳^[5]诱导的肝损伤具有保护作用的基础上,基于 JNK 通路进一步研究老鹳草素对 LPS 导致的免疫性肝损伤小鼠的作用,并探讨其作用机制。

1 材料与试剂

1.1 实验动物

SPF 级昆明种小鼠,雄性,共 60 只,体重 18~22 g,4 周龄,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,在饲养条件(室内温度:18~22 ℃,相对湿度:50%~60%)下适应性饲养 1 周。许可证号:SCXK(湘)2019-0004。

1.2 实验药物与试剂

老鹳草素(上海源叶生物科技有限公司,HPLC ≥98%,批号:P11A8F33736);脂多糖(索莱宝生物科技有限公司);水飞蓟素(美仑生物技术有限公司,批号:M1120A);门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)试剂盒(南京建成生物工程公司);肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白介素-1β(IL-1β)和白介素-6(IL-6)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(伊莱瑞特生物科技有限公司);丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);RIPA 裂解液、

BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(南通市碧云天生物技术研究所);PVDF 膜(Bio-Rad 公司,美国);兔抗鼠 phospho-ASK1 多克隆抗体、兔抗鼠 ASK1 多克隆抗体(武汉三鹰)、兔抗鼠 phospho-MKK4 多克隆抗体、兔抗鼠 MKK4 多克隆抗体、兔抗鼠 phospho-JNK 多克隆抗体、兔抗鼠 JNK 多克隆抗体、兔抗 phospho-c-Jun 多克隆抗体、兔抗鼠 c-Jun 多克隆抗体(北京奥博森生物技术有限公司);β-actin(天锡傲锐东源生物科技有限公司);辣根酶标记的二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);苏木素和伊红染液(北京中杉金桥生物技术有限公司);Super ECL Plus 超敏发光液(北京普利莱基因科技有限公司)。

1.3 仪器

全自动样品快速研磨仪(上海净信事业发展有限公司);TGL-16K 台式高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机厂);切片机(上海涵飞医疗器械有限公司);Olympus BX51 显微镜(日本奥林巴斯);Transferette® 移液器(德国普兰德公司);Epoch 酶标仪(美国 Bio-tek 公司);纯水器(博美生物科技有限公司);冷冻恒温振荡器(常州申光仪器有限公司);垂直电泳仪、转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);石蜡包埋机(浙江省金华市科迪仪器有限公司);Tanon5 200 全自动化化学发光图像分析检测系统(北京原平皓生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 造模及给药

实验前给予 60 只 SPF 级昆明种小鼠自由饮食和活动,7 天之后随机分为正常组、模型组、水飞蓟素组(180 mg/kg)和老鹳草素低、中、高剂量组(50、100、200 mg/kg),每组 10 只。灌胃给药每天 1 次,正常组及模型组小鼠灌胃生理盐水连续 10 天。10 天后,参照文献^[8],模型组和老鹳草素各剂量组小鼠腹腔注射 LPS(10 mg/kg),正常组注射等体积的 0.9% NaCl 溶液。造模后 8 h 正常饮食,之后的 16 h 禁食不禁水,造模时间共 24 h,之后所有小鼠眼球取血并收集肝组织。血液于离心机中分离血清,取部分肝左叶组织,用 4% 多聚甲醛溶液固定,剩余肝组织保存于液氮罐中或者-80 ℃冰箱,可保存半年,为后续实验做准备。

2.2 实验小鼠情况观察

每天观察记录小鼠的外观形态、活动和进食状态、体重改变情况、生存情况和肝组织的外观形态。

2.3 肝组织病理学检测

取4%多聚甲醛溶液固定的肝组织,严格按照HE染色说明书,进行常规石蜡包埋,切片后于二甲苯中脱蜡,酒精中脱水,苏木精和伊红染料中依次染色,树脂封片后于光学显微镜下观察肝组织形态学的改变情况。

2.4 肝损伤指标测定

取离心后的血清,生化法测定肝功能因子ALT、AST、ALP、TBIL和氧化应激指标MDA、GSH-Px、SOD水平;ELISA法检测组织中炎症因子IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的含量。两个测定方法均按照试剂盒的操作步骤加入各反应试剂,根据标准曲线及公式计算绝对OD值,分析计算以上因子的活性或含量。

2.5 蛋白表达情况的测定

用RIPA裂解液从肝组织样品中提取总蛋白,用BCA试剂盒定量。用10%SDS-PAGE电泳分离含30 μ g总蛋白的样品,于220mA冰水浴条件下以恒流转膜1.5 h转移到PVDF膜上。用含8%脱脂奶粉的TBST缓冲盐水封闭 β -actin(1:2 500)、ASK1、p-ASK1、MKK4、p-MKK4、JNK、p-JNK、c-Jun、p-c-Jun(1:1 000)蛋白条带,4℃封闭过夜。用TBST洗涤3次(10 min/次),放入一抗轻摇,4℃下孵育过夜。同上TBST洗涤三次后,在4℃冰箱于含5%脱脂奶粉TBST稀释的二抗中孵育1.5 h。同上TBST洗涤三次后,ECL显色剂按A:B=1:1的比例现配现用,注意避光,用Tanon5 200全自动化学发光图像分析系统显影,以 β -actin为内参,分析蛋

白灰度并计算蛋白相对表达量。

2.6 数据统计学分析

使用SPSS 19.0软件包对所有数据进行方差分析,所有数据均表示为平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$),多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本t检验, $P < 0.05$ 为具有统计学差异, $P < 0.01$ 为显著性差异。

3 实验结果

3.1 老鹳草素对免疫性肝损伤小鼠状况的影响

正常组小鼠生长状态良好,活动敏捷,皮毛有光泽,进饮水正常。模型组小鼠造模后昏昏欲睡,全身皮毛蓬松,反应迟钝,活动减少。水飞蓟素组小鼠精神状态较好,皮毛光泽度稍有减弱,饮食及活动力较正常组有减弱,但无明显差异。老鹳草素低剂量组小鼠精神萎靡,进食减少,倦卧少动,对外界刺激反应迟钝,毛光泽度欠佳。老鹳草素中、高剂量组小鼠精神状态较好,皮毛光泽度和水飞蓟素组相当。

3.2 老鹳草素对免疫性肝损伤小鼠肝组织形态的影响

肉眼观察,正常组小鼠肝脏外观正常,被膜光滑完整,颜色鲜红有光泽,边缘锐利,质地柔软。模型组小鼠肝脏肿大,颜色轻微发黄、泛白,表面呈现颗粒斑点状。与模型组比较,老鹳草素中、高剂量组和水飞蓟素组肝脏表面光滑,有光泽,肝损伤均有所减轻,而老鹳草素低剂量组减轻不明显。

HE染色显示,显微镜下可见正常组(图1A)小鼠整个肝小叶结构清晰完整,肝脏细胞基本无病变、

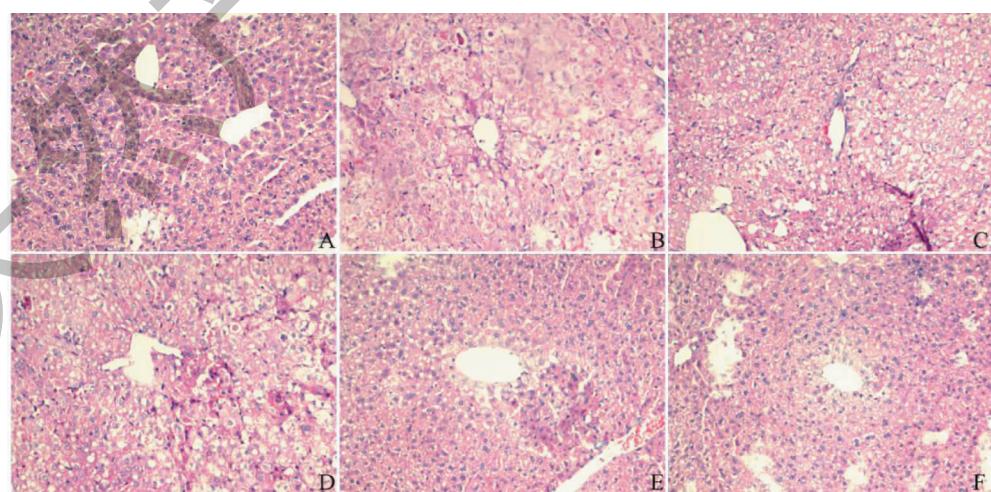


图1 肝组织HE染色病理检查图(200 \times)

Fig. 1 HE staining pathological examination of liver tissue (200 \times)

注:A:正常组;B:模型组;C:水飞蓟素组;D:老鹳草素低剂量组;E:老鹳草素中剂量组;F:老鹳草素高剂量组;下同。Note: A: Normal group;

B: Model group; C: Silymarin group; D: Geraniin-low dose group; E: Geraniin-medium dose group; F: Geraniin-high dose group; The same below.

坏死和凋亡,肝脏内无炎症细胞浸润。模型组(图1B)肝小叶结构大部分不完整,破损严重,肝小叶坏死和裂解,并可见大量枯否细胞增生和炎症淋巴细胞的浸润。水飞蓟素组(图1C)肝组织结构轻度改变,肝细胞点状坏死,炎性细胞浸润为轻度。老鹳草素低剂量组(图1D)肝组织结构改善不明显,而老鹳草素中剂量组(图1E)和老鹳草素高剂量组(图1F)肝组织结构基本正常,肝细胞轻度固缩、坏死。结果提示,老鹳草素可改善LPS诱导的小鼠免疫性

肝损伤的病理变化,具体结果见图1。

3.3 老鹳草素对免疫性肝损伤小鼠血清肝功能因子ALT、AST、ALP和TBIL的影响

与正常组比较,模型组小鼠血清肝功能因子ALT、AST、ALP和TBIL水平显著升高,差异均具显著性($P < 0.01$)。与模型组比较,老鹳草素中、高剂量组小鼠血清肝功能因子ALT、AST、ALP和TBIL水平均呈现显著下降趋势,差异均具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。具体结果见表1。

表1 老鹳草素对血清中肝功能因子ALT、AST、ALP和TBIL的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of geraniin on the liver function factors ALT, AST, ALP and TBIL in serum($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	给药剂量 Dose (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	TBIL (μmol/L)
正常组 Normal	-	21.33 ± 4.01	54.20 ± 7.62	32.46 ± 5.55	4.21 ± 0.51
模型组 Model	-	154.55 ± 20.11 ^{##}	167.38 ± 22.91 ^{##}	102.06 ± 15.32 ^{##}	10.68 ± 1.41 ^{##}
水飞蓟素组 Silymarin	180	84.22 ± 11.27 ^{* *}	100.28 ± 15.83 ^{* *}	63.17 ± 8.34 ^{* *}	5.36 ± 0.64 ^{* *}
老鹳草素低剂量组 Geraniin-L	50	139.01 ± 13.29	150.77 ± 18.64	89.39 ± 10.58	9.52 ± 0.94
老鹳草素中剂量组 Geraniin-M	100	97.11 ± 12.54 ^{* *}	117.32 ± 13.57 ^{* *}	75.36 ± 9.34 ^{* *}	9.37 ± 0.77 [*]
老鹳草素高剂量组 Geraniin-H	200	81.22 ± 14.91 ^{* *}	94.13 ± 9.73 ^{* *}	68.46 ± 8.26 ^{* *}	5.49 ± 0.67 ^{* *}

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

Note: Compared with normal group, ^{##} $P < 0.01$; Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; The same below.

3.4 老鹳草素对免疫性肝损伤小鼠血清中氧化应激因子MDA、GSH-Px、SOD水平的影响

采用MDA、GSH-Px与SOD测定试剂盒检测LPS诱导的免疫性肝损伤血清氧化应激水平的影响,结果显示LPS造模后,能够使LPS诱发的SPF级昆明种小鼠血清SOD、GSH-Px活力降低,而MDA

水平升高($P < 0.01$),说明LPS能够加重小鼠氧化应激水平。与模型组相比,老鹳草素中、高剂量组可提高血清中SOD、GSH-Px活力,降低MDA水平($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),这些数据证实老鹳草素起到降低氧化应激的作用,具体结果见表2。

表2 老鹳草素对血清中氧化应激因子MDA、GSH-Px、SOD水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of geraniin on the levels of oxidative stress factors MDA, GSH-Px and SOD in serum($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	给药剂量 Dose (mg/kg)	MDA (nmol/mL)	GSH-Px (IU/mL)	SOD (IU/mL)
正常组 Normal	-	4.12 ± 0.53	69.85 ± 8.92	223.16 ± 29.28
模型组 Model	-	18.57 ± 2.31 ^{##}	19.23 ± 2.88 ^{##}	128.62 ± 17.55 ^{##}
水飞蓟素组 Silymarin	180	10.67 ± 1.35 ^{* *}	24.21 ± 4.83 [*]	151.98 ± 19.86 [*]
老鹳草素低剂量组 Geraniin-L	50	16.24 ± 1.72 [*]	24.61 ± 4.01 [*]	147.22 ± 18.21
老鹳草素中剂量组 Geraniin-M	100	10.35 ± 1.21 ^{* *}	36.33 ± 3.99 ^{* *}	172.62 ± 20.21 ^{* *}
老鹳草素高剂量组 Geraniin-H	200	8.59 ± 0.93 ^{* *}	43.28 ± 5.54 ^{* *}	186.69 ± 18.23 ^{* *}

3.5 老鹳草素对免疫性肝损伤小鼠组织中炎症因子IL-1β、IL-6和TNF-α的影响

与正常组相比,模型组小鼠组织中炎症因子IL-1β、IL-6和TNF-α水平显著升高,差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,老鹳草素中、高

剂量组小鼠组织炎症因子IL-1β、IL-6和TNF-α水平均显著下降,差异均具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),显示其具有抑制肝脏炎症反应的作用。具体结果见表3。

表 3 老鹳草素对肝组织中炎症因子 IL-1 β , IL-6 及 TNF- α 表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 Effect of geraniin on the expression levels of inflammatory factors IL-1 β , IL-6 and TNF- α in liver tissue ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	给药剂量 Dose (mg/kg)	IL-1 β (pg/mg)	IL-6 (pg/mg)	TNF- α (pg/mg)
正常组 Normal	-	25.64 ± 3.55	31.21 ± 4.01	33.22 ± 4.11
模型组 Model	-	134.25 ± 18.67 ^{##}	146.55 ± 18.99 ^{##}	118.20 ± 15.62 ^{##}
水飞蓟素组 Silymarin	180	80.66 ± 10.32 ^{* *}	126.36 ± 12.22 [*]	91.22 ± 10.62 ^{* *}
老鹳草素低剂量组 Geraniin-L	50	123.35 ± 14.62	124.92 ± 14.83 [*]	106.62 ± 14.76
老鹳草素中剂量组 Geraniin-M	100	96.32 ± 11.86 ^{* *}	124.49 ± 12.03 [*]	88.61 ± 10.22 ^{* *}
老鹳草素高剂量组 Geraniin-H	200	73.61 ± 9.58 ^{* *}	109.56 ± 9.86 ^{* *}	75.16 ± 9.36 ^{* *}

3.6 老鹳草素对免疫性肝损伤小鼠肝组织中 JNK 信号通路中蛋白的表达的影响

WB 实验结果显示:与正常组比较,模型小鼠肝脏内 p-ASK1/ASK1、p-MKK4/MKK4、p-JNK/JNK 以及 p-c-Jun/c-Jun 的比值明显上调,数据表明均有显著性差异($P < 0.01$)。与模型组相比,老鹳草素中、

高剂量组能显著抑制 p-ASK1/ASK1、p-MKK4/MKK4、p-JNK/JNK、p-c-Jun/c-Jun 比值的上调,差异均具有统计学意义($P < 0.01$),初步显示老鹳草素对免疫性肝损伤小鼠肝组织中的 JNK 信号通路具有调控作用。具体结果见图 2。

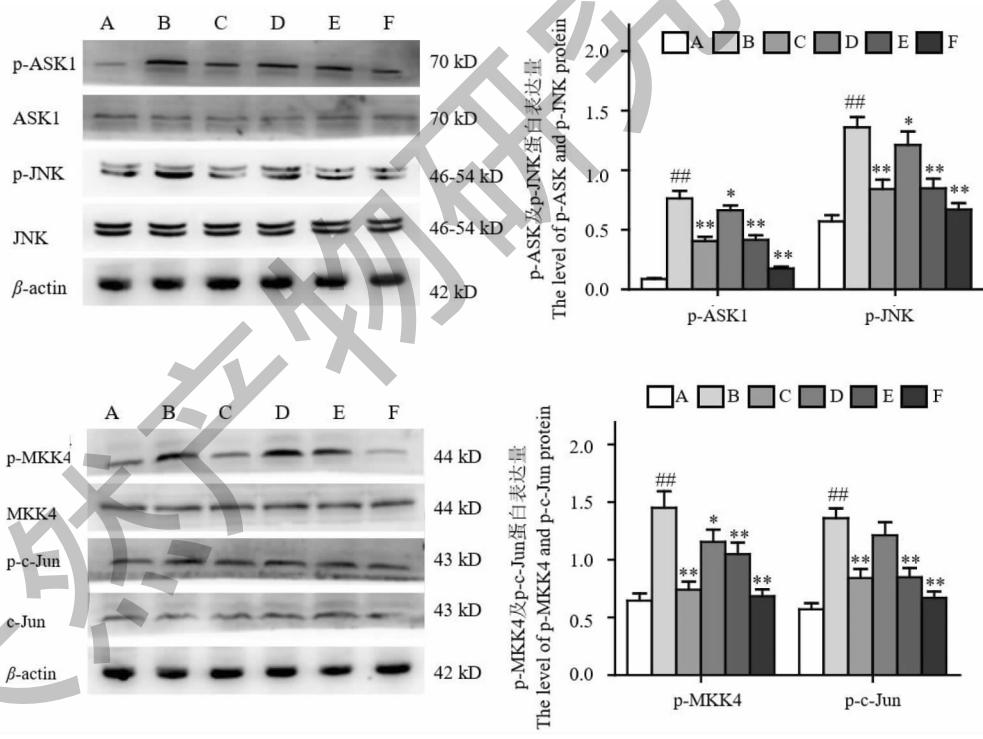


图 2 老鹳草素对免疫性肝损伤小鼠肝组织中 JNK 信号通路的影响

Fig. 2 The effect of geraniin on JNK signaling pathway in liver tissues of immunological liver injury mice

4 讨论

肝脏富含各种酶,ALT 和 AST 是最常见的两种,一般地,肝组织中转氨酶的含量是血液的 100 倍,1% 肝细胞损伤,血清中转氨酶的水平就增加 1 倍,这是反馈出肝损伤的最早和最敏感的标志之

—^[9,10]。ALP 和 TBIL 被认为是临床判断肝损伤的重要指标^[9]。SOD 是体内抗氧化系统中重要的酶系抗氧化剂,经反应生成氧气和过氧化氢而清除体内氧自由基,从而抑制后续的脂质过氧化反应^[11]。MDA 是过氧化作用的终产物,严重威胁细胞膜结构

的完整性,使细胞肿胀、坏死^[12],组织中 MDA 的含量高低可间接反映肝脏受自由基攻击时的破坏程度^[11]。GSH 不仅是体内新陈代谢的重要物质和最重要的还原性物质,还是 GSH-Px 的底物,能消除氧自由基和超氧阴离子等有毒物质,阻止过氧化物入侵细胞膜^[13]。由实验结果中可见,本实验由 LPS 诱导的免疫性肝损伤小鼠血清 ALT、AST、ALP、TBIL 以及 MDA 水平显著上升,SOD 和 GSH-Px 活力明显降低,这与 Chou 等^[8]报道一致。老鹳草素处理后,小鼠血清中肝功能因子 ALT、AST、ALP、TBIL 以及氧化应激指标 MDA 水平下降,SOD 和 GSH-Px 活力明显上升。根据以上实验结果,我们推测老鹳草素防治免疫性肝损伤与抑制转氨酶升高、抗氧化作用有关。

IL-1 β 是炎症反应中的关键性靶点,虽无法直接对肝脏造成损伤,但是高浓度的 IL-1 β 能诱导炎性细胞与免疫细胞产生一系列细胞炎症因子,从而引起炎症反应以及错误的免疫应答^[14]。TNF- α 的产生具体机制为肝损伤发生后,细胞膜通透性增加,促使 Ca²⁺ 内流,活化库普弗细胞,导致 TNF- α 的大量分泌,加重肝脏的损伤程度^[15]。同时,局部组织发生炎症细胞浸润,TNF- α 可诱导 IL-6 生成,IL-6 可作为 TNF- α 的第二介质发挥作用,导致肝内大量细胞变性坏死,发生重型肝炎^[16]。在本研究中,给予 LPS 造模后,小鼠肝脏组织中的 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 水平显著增高。这些指标数据的升高趋势与 Dong 等^[17]相同,与正常组比较均具有显著性差异。有趣的是,通过老鹳草素的治疗可以显著性逆转 LPS 诱导的这些变化,主要表现为降低组织中 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 水平,缓解炎症反应。这些结果均表明,老鹳草素尚可通过抗炎作用来防治免疫性肝损伤。

JNK 是 MAPKs 通路中的主要成员之一,参与信号转导、炎症反应、细胞凋亡等过程^[18]。在细胞静止状态下,JNK 主要位于细胞质,经上游信号系列氨基酸残基磷酸化修饰的级联反应而激活后,胞浆中的 JNK 移位到细胞核使 JNK 完全活化并具有酶催化活性,参与细胞调控^[19]。进一步的研究表明,JNK 通路被激活后,细胞出现损伤,最终引发凋亡^[20]。值得注意的是,JNK 被抑制后,细胞损伤和凋亡同样受到抑制^[21]。ASK1 位于 JNK 通路的上游,正常生理状态下与相应的蛋白结合形成复合物,而处于病理状态时,ASK1 能通过 MAP2K(如 MKK4 和 MKK7)在苏氨酸 183 和酪氨酸 185 的双重磷酸

化激活^[22]。尚有实验证明 ASK1 过表达可诱导肝细胞凋亡,而沉默 ASK1 可抑制细胞凋亡^[23]。c-Jun 位于 JNK 信号通路的下游,活化的 JNK 可进一步使 c-Jun 发生磷酸化,在细胞的信号转导、增殖、凋亡等生命进程中发挥重要作用^[24]。此外,临幊上已将 c-Jun 视为炎症反应、癌症等多种疾病的研究靶点^[25]。在本实验中,与正常组相比,模型组中 p-ASK1/ASK1、p-MKK4/MKK4、p-JNK/JNK、p-c-Jun/c-Jun 的比值均呈现升高趋势,提示 JNK 通路被激活;老鹳草素各剂量组组织中 p-ASK1/ASK1、p-MKK4/MKK4、p-JNK/JNK 以及 p-c-Jun/c-Jun 的比值较模型组均有不同程度的下调,证明老鹳草素抑制了 JNK 的活化及 JNK 信号通路中关键蛋白的表达,减弱肝细胞凋亡活动。

综上所述,老鹳草素能抑制升高的转氨酶、氧化应激水平和炎症反应,并可调控 JNK 信号通路,减弱凋亡活动,显示其可明显改善免疫性肝损伤。

参考文献

- Wang ZL, Wang HX. Study on protective effect of Astragalus polysaccharides on immunological liver injury[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Clin Med (中药药理与临床), 2013, 29(2):77-80.
- Mu M, Zhang Z, Cheng Y, et al. Augmenter of liver regeneration (ALR) restrains concanavalin A-induced hepatitis in mice[J]. Int Immunopharmacol, 2016, 35:280-286.
- Wang FS, Fan JG, Zhang Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. Hepatology, 2014, 60:2099-2108.
- Li JN, Li ZM, Gao Y, et al. Protective effect and mechanism of geranium on D-galactosamine-induced liver injury in mice [J]. J Chin Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2019, 25(15):116-121.
- Zhang F, Ren Z, Gao Y, et al. Study on the hepatoprotective effect of geranium on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice based on TLR-4/NF- κ B signaling pathway [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2018, 41:2906-2910.
- Wang P. The protective effect of geranium on H₂O₂-induced oxidative stress damage in HepG2 cells[D]. Harbin: Northeast Forestry University (东北林业大学), 2016.
- Hongtan W, Haiyue P, Yupei C, et al. Anti-inflammatory effect of a polyphenol-enriched fraction from *Acalypha wilkesiana* on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages and acetaminophen-induced liver injury in mice[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018:7858094.

- 8 Chou KK, Gao XL, Ma XY, et al. Study on the effect of Bidens decoction on improving learning and memory impairment in mice caused by LPS-induced inflammation of central nervous system [J]. *J Chin Med Mater (中药材)*, 2020, 43: 1712-1718.
- 9 Ling JA, Chen Y, Xu XH, et al. Protective effect of Jianyeer-cao aqueous extract on acute liver injury induced by Con A in mice [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Clin Med (中药药理与临床)*, 2017, 33(3): 111-114.
- 10 Tang K, Jin BQ. Research progress of monocyte subsets [J]. *Chin J Cell Mol Immunol (细胞与分子免疫学杂志)*, 2016, 32: 840-844.
- 11 Xiao Y, Li XW, Ding H. Protective effects of fucose on immunological liver injury in mice [J]. *Food Sci (食品科学)*, 2017, 38(13): 155-159.
- 12 Zhao, CX, Zhang YM, Liu HS, et al. Protective effect of Baogan mixture against acute immunologic liver injury induced by Con A in mice [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2017, 39: 1144-1148.
- 13 Laura L, Montserrat M, Josep M, et al. Reactive oxygen species mediate liver injury through parenchymal nuclear factor- κ B inactivation in prolonged ischemia/reperfusion [J]. *Am J Pathol*, 2009, 174: 1776-1785.
- 14 Wang Q, Zhang YX, Shi C et al. Effect of Broussonetiae Fructus on oxidative stress factors in rats with drug-induced liver injury [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2019, 31: 1617-1623.
- 15 Yu YN, Li Y. Calpain and liver damage [J]. *Chin Pharm Bull (中国药理学通报)*, 2008, 24: 708-711.
- 16 Chen Y, Guo J, Qian G, et al. Gut dysbiosis in acute-on-chronic liver failure and its predictive value for mortality [J]. *J Gastroen Hepatol*, 2015, 30: 1429-1437.
- 17 Dong XH, Wang B, Wang CY, et al. Study on the protective mechanism of arctigenin on lipopolysaccharide-induced liver injury in mice [J]. *Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志)*, 2020, 36: 1815-1817.
- 18 Qing CM, Su S, Wei X, et al. Expression of JNK signal pathway in mice with acute liver injury induced by lipopolysaccharide [J]. *Chin J Mod Med (中国现代医学杂志)*, 2015, 25(20): 7-11.
- 19 Mu LY, Li JX, Zhang QY, et al. Effects of JieduanNiwan Formula on the c-Jun, p-JNK of liver tissue in acute-on-chronic liver failure rats [J]. *J Cap Med Univ (首都医科大学学报)*, 2017, 38: 282-288.
- 20 Wei N, He HB, Zhang CC, et al. Research development between JNK pathway and apoptosis [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther (中国临床药理学与治疗学)*, 2013, 18: 807-812.
- 21 Kim HY, Lee SM. Ferulic acid attenuates ischemia-a/reperfusion-induced hepatocyte apoptosis via inhibition of JNK activation [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 45: 708-715.
- 22 Zhang Q, Zhang DJ, Cong X, et al. The cell apoptosis mediated by JNK [J]. *Chin J Anim Sci (中国畜牧杂志)*, 2015, 51(23): 87-92.
- 23 Goldman, EH, Chen L, Fu H. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by reactive oxygen species through dephosphorylation at serine 967 and 14-3-3 dissociation [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 10442-10449.
- 24 Li K, Cao RJ, Zhu ZH. Research progress of JNK signal pathway [J]. *Chin J Lab Diagn (中国实验诊断学)*, 2015, 19: 1596-1598.
- 25 Zhi Q, Li FX, Yang YX, et al. Plant anthocyanin exert antitumor effect and mechanism of by JNK signaling pathway [J]. *Food Mach (食品与机械)*, 2017, 33(7): 146-150.