

楮实子通过抑制内质网应激途径保护 APAP 诱导的小鼠肝损伤

高晶淼¹, 王婷婷², 彪雅宁¹, 顾亚茹¹, 张睦清³, 王茜¹, 张一昕^{1*}

(1. 河北中医学院药学院, 河北省中药资源利用与质量评价国际联合研究中心, 河北省高校中药组方剂应用技术研发中心, 石家庄 050200;
2. 沧州市人民医院, 沧州 061000; 3. 河北省中医院, 石家庄 050011)

[摘要] 目的:探讨楮实子基于内质网应激途径防治对乙酰氨基酚(APAP)致药物性肝损伤(DILI)的作用机制。方法:将60只C57BL/6N小鼠随机分为6组:正常组、模型组、水飞蓟宾组(3.4 g·kg⁻¹)和楮实子高、中、低剂量组(3.0、1.5、0.75 g·kg⁻¹),每组10只。采用APAP(800 mg·kg⁻¹)灌胃的方法造模,同时给药治疗,连续10 d。检测血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)的含量或活性;苏木素-伊红(HE)染色观察肝组织病理形态变化;透射电镜观察肝细胞线粒体形态变化;比色法检测血清和肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、总抗氧化能力(T-AOC)、谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、三磷酸腺苷(ATP)的活性或含量;免疫荧光法检测肝组织中活性氧(ROS)的表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肝组织葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)的mRNA表达水平。结果:与正常组比较,模型组小鼠血清中ALT、AST、TBIL、DBIL活性或含量显著升高($P<0.01$);MDA和GSSG含量显著升高($P<0.01$),SOD、T-AOC、GSH、GSH-Px、ATP含量或活性显著降低($P<0.01$);肝细胞出现肿胀、炎性浸润及片状坏死;肝细胞线粒体肿胀破裂;GRP78、CHOP和JNK mRNA表达均显著增强($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组小鼠血清中ALT、AST、TBIL、DBIL含量或活性明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);MDA和GSSG含量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),SOD、T-AOC、GSH、GSH-Px、ATP含量或活性明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);肝细胞肿胀、炎性浸润及片状坏死减少;肝细胞线粒体恢复双层膜结构;GRP78、CHOP和JNK mRNA表达均明显减弱($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:楮实子对APAP肝损伤小鼠具有防治作用,可能与减轻内质网应激、降低体内氧化应激水平有关。

[关键词] 楮实子; 对乙酰氨基酚; 药物性肝损伤; 内质网应激

[中图分类号] R2-0;R33;R256.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)16-0066-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221544

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220615.1511.003.html>

[网络出版日期] 2022-06-16 14:32

Broussonetiae Fructus Protects Against APAP-induced Liver Injury in Mice by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress Pathway

GAO Jingmiao¹, WANG Tingting², BIAO Yaning¹, GU Yaru¹, ZHANG Muqing³,
WANG Xi¹, ZHANG Yixin^{1*}

(1. School of Pharmacy, International Joint Research Center on Resource Utilization and Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine (TCM) of Hebei Province, Application Technology Research and Development Center of TCM in Hebei Universities, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China; 2. Cangzhou People's Hospital, Cangzhou 061000, China;
3. Hebei Provincial Hospital of TCM, Shijiazhuang 050011, China)

[收稿日期] 2022-02-16

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(N081503268);河北省高等学校科学技术研究青年拔尖计划项目(BJ2016038);河北省中医药管理局科研计划项目(2020308,2022362)

[第一作者] 高晶淼,在读硕士,从事中药及其复方临床应用和机制研究,E-mail:2788044604@qq.com

[通信作者] *张一昕,博士,教授,博士生导师,从事中药及其复方临床应用和机制研究,E-mail:hbzyx123@163.com

[Abstract] Objective: To explore the mechanism of *Broussonetiae Fructus* (BF) in preventing and treating drug-induced liver injury (DILI) induced by acetaminophen (APAP) through the endoplasmic reticulum stress pathway. **Method:** Sixty C57BL/6N mice were randomly divided into normal group, model group, silybin group ($3.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and high-, medium- and low-dose BF groups ($3.0, 1.5, 0.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), with 10 mice in each group. The DILI model was induced by intragastric administration of APAP at $800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, and drugs were administered simultaneously for 10 consecutive days. The serum contents or activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBIL), and direct bilirubin (DBIL) were measured. Hematoxylin-eosin(HE) staining was performed to observe the pathological changes in liver tissues. The morphological changes in liver mitochondria were observed by transmission electron microscopy. The activities or content of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), total antioxidant capacity (T-AOC), glutathione (GSH), glutathione disulfide (GSSG), glutathione peroxidase (GSH-Px), and adenosine triphosphate (ATP) in the serum and liver tissues were detected by the colorimetric method. The expression of reactive oxygen species (ROS) in liver tissues was detected by immunofluorescence. The gene expression of glucose-regulated protein 78 (GRP78), CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP), and c-Jun N-terminal kinase (JNK) in liver tissues was detected by Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR). **Result:** Compared with the normal group, the model group showed increased serum activities or content of ALT, AST, TBIL, and DBIL ($P < 0.01$), increased MDA and GSSG contents ($P < 0.01$), decreased contents or activities of SOD, T-AOC, GSH, GSH-Px, and ATP ($P < 0.01$), swollen hepatocytes with inflammatory infiltration and lamellar necrosis, swollen and broken mitochondria of hepatocytes, and increased mRNA expression of GRP78, CHOP, and JNK ($P < 0.01$). Compared with the model group, the groups with drug intervention showed decreased serum content or activities of ALT, AST, TBIL, and DBIL ($P < 0.05, P < 0.01$), reduced MDA and GSSG contents ($P < 0.05, P < 0.01$), and increased contents or activities of SOD, T-AOC, GSH, GSH-Px, and ATP ($P < 0.05, P < 0.01$), improved swollen hepatocytes, inflammatory infiltration, and lamellar necrosis, recovered bilayer membrane structure in mitochondria of hepatocytes, and decreased mRNA expression of GRP78, CHOP, and JNK ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** BF has preventive and therapeutic effects on APAP-induced DILI mice, and the mechanism may be related to the reduction of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress level *in vivo*.

[Keywords] *Broussonetiae Fructus*; acetaminophen; drug-induced liver injury; endoplasmic reticulum stress

药物性肝损伤(DILI)是指药物在使用过程中,因药物本身或其代谢产物或患者对药物超敏性等因素所引发的肝脏损害^[1]。DILI的严重程度可以从无症状的肝酶升高到暴发性肝衰竭甚至死亡,是最常见且严重的药物不良反应之一。某些西方国家基于人群的前瞻性研究显示,DILI在普通人群的发病率为13.9~19人/10万人,我国DILI发病率超过西方发达国家^[2-3]。对乙酰氨基酚(APAP)既是诱发DILI的主要原因,也是筛选抗DILI药物活性与机制模型的诱导药物^[4]。APAP主要通过氧化应激途径诱发DILI,尤其是内质网极易受到氧化损伤的攻击,因此,内质网应激与肝损伤有密切联系,为DILI发生发展的重要环节^[5]。

楮实子为桑科植物构树的干燥成熟果实,味甘

性寒,具有清肝泄热、通利水湿之功^[6]。据报道,临床上应用楮实子复方治疗肝炎和肝硬化具有较好的疗效。周仲瑛教授常使用楮实子与黑豆配伍治疗乙型肝炎及肝硬化^[7]、岭南名老中医岑鹤龄选用楮实子、女贞子、酸枣仁等中药自拟三子养肝汤,治疗慢性肝炎多取效较佳^[8]。药理研究发现楮实子的水提液和醇提物均有抗氧化作用^[9],课题组前期研究也证实楮实子对DILI大鼠具有抗氧化作用,但其发挥抗氧化损伤的机制尚不明确^[10]。本实验采用APAP复制DILI小鼠模型,观察了其对实验小鼠肝功能、氧化应激指标、肝组织病理形态、线粒体超微结构以及肝组织葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)mRNA的影响,从内质网应激

途径探讨楮实子防治 APAP 致 DILI 的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 C57BL/6N 小鼠 60 只, 体重(18±2)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 SCXK(京)2016-0006。实验动物饲养于温度、湿度恒定, 光照明暗各 12 h 的清洁级实验室内, 自由进食饮水。该实验经河北中医学院伦理委员会批准同意, 编号 DWLL2021057。

1.2 药物 楮实子(配方颗粒, 广东一方制药有限公司, 批号 9055281); 水飞蓟宾胶囊(天津天士力圣特制药有限公司, 每粒含水飞蓟宾 35 mg, 批号 H20040299), 实验时将配方颗粒和水飞蓟宾胶囊均用 100 °C 蒸馏水充分溶解; APAP(上海源叶生物科技有限公司, 批号 B14A9E58584, 纯度 99%); 羧甲基纤维素钠(上海阿拉丁试剂有限公司, 批号 C299502), 实验时 APAP 用 40 °C 生理盐水并加入 0.5% 羧甲基纤维素钠配制所需浓度药液。

1.3 试剂 丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)试剂盒(深圳市库贝尔生物科技股份有限公司, 批号分别为 201201、201001、201001、210101); 苏木素-伊红(HE)染液套装、RNA 提取液、DAPI 染液(武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号分别为 G1003、G3013、G1012); 超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、总抗氧化能力(T-AOC)、还原型谷胱甘肽(GSH)/氧化型谷胱甘肽(GSSG)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、三磷酸腺苷(ATP)试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号分别为 A001-3、A003-2-2、A015-2-1、A016-2-1、A005-1-2、A095-1-1); 三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司, 批号分别为 10006818、80109218、10009218); SureScript™ First-Strand cDNA Synthesis Kit、Blaze Taq™ SYBRFree 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Mix 2.0(广州易锦生物技术有限公司, 批号分别为 QP057-2、QP042); 其他试剂均为国产分析纯。

1.4 仪器 H17502 型冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); JB-P5 型包埋机(武汉俊杰电子有限公司); RM2016 型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司); BX43F 型显微镜[奥林巴斯(中国)有限公司]; iChem-530 型全自动生化分析仪(深圳库贝尔生物科技股份有限公司); Versa Max™ 型多功能酶标仪(美国 Molecular Devices); HT7700 型透射电子显微镜(日本日立公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药 60 只小鼠适应性喂养 1 周后, 按随机数字表法随机分为正常组、模型组、水飞蓟宾组 and 楮实子高、中、低剂量组, 每组 10 只。楮实子给药剂量结合 2020 年版《中华人民共和国药典(一部)》^[11] 规定的楮实子用量及临床常用剂量, 选定 10 g 为等效剂量, 定为中剂量, 依据《中药药理研究方法学》^[12] 中人与小鼠体表面积系数法折算实验用量为 1.5 g·kg⁻¹, 低剂量为 0.75 g·kg⁻¹、高剂量为 3.0 g·kg⁻¹, 水飞蓟宾组给药剂量为 3.4 g·kg⁻¹; 采用边造模边给药的方法^[13], 于每天上午 8:00 各给药组灌胃相应治疗药物, 正常组和模型组灌胃等体积生理盐水; 每天下午 5:00 正常组灌胃等体积生理盐水, 其余各组按照 0.8 g·kg⁻¹ 的剂量灌胃 APAP 复制 DILI 模型, 给药体积为 10 mL·kg⁻¹, 连续给药 10 d。以实验小鼠血清 ALT、AST、TBIL、DBIL 含量或活性的升高为造模成功的标准^[14]。

2.2 标本采集 实验结束后摘眼球取血, 于 4 °C、3 500 r·min⁻¹ 离心 15 min(离心半径 8.6 cm), 吸取上清以备血清生化指标检测。颈椎脱臼处死小鼠, 剖腹取出肝脏, 切取适宜大小肝组织用 1% 戊二醛固定液固定, 以备透射电镜观察; 另取 1 份肝组织置于冻存管中, 液氮冻存以备肝组织 mRNA 及相关指标检测; 再取 1 份肝组织用 4% 多聚甲醛固定, 以备肝脏病理形态观察。

2.3 指标检测

2.3.1 血清生化指标检测 全自动生化分析仪检测血清中 ALT、AST、TBIL、DBIL 的含量或活性; 比色法检测血清中 MDA、SOD、T-AOC、GSH、GSSG、GSH-Px 的含量或活性, 均严格按照说明书操作。

2.3.2 HE 染色观察肝脏病理形态变化 将 4% 多聚甲醛固定的肝组织取出, 经脱水、包埋、切片、染色、封片后, 显微镜下观察病理变化。

2.3.3 透射电镜观察肝细胞线粒体形态变化 取出 1% 戊二醛中固定的肝组织, 经 1% 锇酸室温避光固定 2 h、室温脱水、渗透包埋、聚合、超薄切片、染色后, 透射电镜下观察并拍照。

2.3.4 肝组织氧化应激指标和 ATP 含量检测 将冻存的肝组织制成 10% 的肝组织匀浆, 于 4 °C 条件下, 2 500 r·min⁻¹ 离心 10 min(离心半径 8.6 cm), 吸取上清, 按试剂盒说明检测 MDA、SOD、T-AOC、GSH、GSSG、GSH-Px、ATP 的含量或活性。

2.3.5 免疫荧光检测肝组织 ROS 含量 将冻存的肝组织包埋切片后, 经淬灭组织自发荧光、ROS 染

色、DAPI复染、封片后,置于荧光显微镜下观察并拍照。DAPI染出来的细胞核在紫外的激发下为蓝色,阳性表达为红光。

2.3.6 Real-time PCR检测肝组织 GRP78、CHOP、JNK mRNA表达 取冻存的肝组织,TRIzol法提取总RNA,反转录为cDNA后加入扩增反应体系,进行Real-time PCR检测,PCR反应条件为95℃预变性30 s,1个循环;95℃变性10 s,60℃退火、延伸30 s,40个循环。按照相对定量方法分析,以β-肌动蛋白(β-actin)为内参,用2^{-ΔΔC_t}法表示mRNA的相对表达量。引物序列由生工生物工程(上海)有限公司设计,见表1。

2.4 统计学方法 采用SPSS 25.0软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料多组间比较采用单因素方差分析,方差齐用最小显著性差异法(LSD)检验,方差不齐用Dunnett' T3检验,以P<0.05表示差异有统计学意义。

表2 楮实子对DILI小鼠肝功能指标的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Broussonetiae Fructus on liver function index of DILI mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	TBIL/μmol·L ⁻¹	DBIL/μmol·L ⁻¹
正常组		36.39±6.34	47.67±3.55	3.86±0.37	2.93±0.38
模型组		108.46±13.53 ¹⁾	86.21±5.69 ¹⁾	6.82±1.24 ¹⁾	4.69±0.67 ¹⁾
水飞蓟宾组	3.4	58.33±7.56 ³⁾	61.27±4.34 ²⁾	5.44±0.86 ³⁾	3.38±0.56 ²⁾
楮实子高剂量组	3.0	44.47±5.13 ³⁾	55.33±6.67 ³⁾	3.77±0.56 ³⁾	2.92±0.31 ³⁾
楮实子中剂量组	1.5	39.04±7.02 ³⁾	60.43±5.59 ²⁾	4.67±0.53 ³⁾	3.11±0.32 ²⁾
楮实子低剂量组	0.75	45.00±5.22 ³⁾	63.55±4.60 ²⁾	4.61±0.75 ³⁾	3.16±0.58 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01(表3-表6同)

3.2 对DILI小鼠肝脏病理形态学的影响 HE染色显示,正常组肝小叶结构清晰,肝细胞索排列整齐,以中央静脉为中心,向四周呈放射状排列,肝血窦之间无肿胀,肝细胞大小一致,细胞核呈圆形位于中央,胞浆完整。模型组肝细胞索排列不整齐,难以观察到放射状,肝细胞肿胀,大小不一致,可见炎性细胞浸润及片状坏死。各给药组肝索排列趋于整齐,肝血窦及肝细胞肿胀减轻,炎性细胞浸润明显减轻,未见坏死灶,并可见少量再生肝细胞。见图1。

3.3 对DILI小鼠肝脏线粒体形态的影响 正常组线粒体呈椭圆形,大小一致,双层膜结构清晰,内部致密,可见片状嵴;模型组线粒体数量减少,部分固缩,形态趋于圆形,内部肿胀,双层膜破裂,密度降低,嵴断裂;各给药组线粒体形态趋于椭圆形,大小基本一致,恢复双层膜结构,密度升高,嵴为片状。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GRP78	上游 GTGTGTGAGACCAGAACCGT	77
	下游 GCAGTCAGGCAGGAGTCTTA	
CHOP	上游 CCTGAGGAGAGAGTGTCCAG	122
	下游 GACACCGTCTCCAAGGTGAA	
JNK	上游 CCACCAAAGATCCCGGACAA	143
	下游 TGTGCTAAAGGAGACGGCTG	
β-actin	上游 TTCGCGGGCGACGAT	85
	下游 GACCCATCCCACCATCACAC	

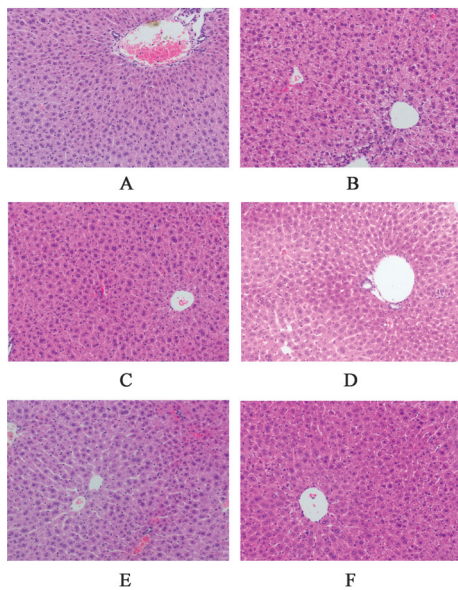
3 结果

3.1 对DILI小鼠肝功能指标的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清ALT、AST活性和TBIL、DBIL含量显著升高(P<0.01);与模型组比较,各给药组小鼠血清中ALT、AST活性和TBIL、DBIL含量明显降低(P<0.05,P<0.01)。见表2。

见图2。

3.4 对DILI小鼠血清SOD、MDA、T-AOC、GSH、GSSG、GSH-Px活性或含量的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清中SOD、T-AOC、GSH、GSH-Px含量或活性显著降低(P<0.01),MDA和GSSG含量显著升高(P<0.01);与模型组比较,各给药组小鼠血清中SOD、T-AOC、GSH、GSH-Px含量或活性明显升高(P<0.05,P<0.01),MDA和GSSG含量明显降低(P<0.05,P<0.01)。见表3。

3.5 对DILI小鼠肝组织SOD、MDA、T-AOC、GSH、GSSG、GSH-Px活性或含量的影响 与正常组比较,模型组小鼠肝组织SOD、GSH、GSH-Px、T-AOC含量或活性显著降低(P<0.01),MDA、GSSG含量显著升高(P<0.01);与模型组比较,各给药组小鼠肝组织中SOD、GSH、GSH-Px、T-AOC含量或活性明显升高(P<0.05,P<0.01),MDA、GSSG含量明显



注:A.正常组;B.模型组;C.水飞蓟宾组;D.楮实子高剂量组;E.楮实子中剂量组;F.楮实子低剂量组(图2和图3同)

图1 楮实子对DILI小鼠肝脏病理形态学的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of Broussonetiae Fructus on histopathological morphology of DILI mice (HE,×200)

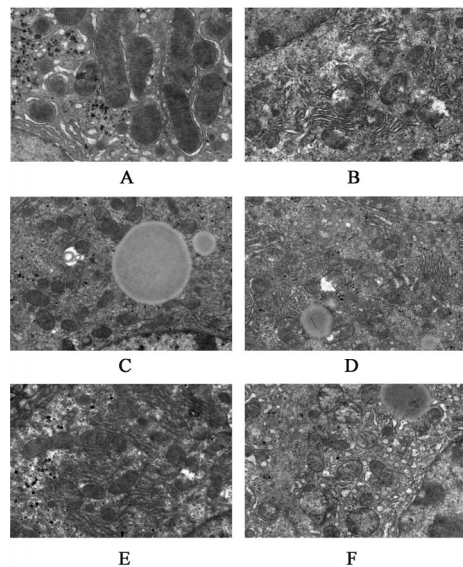


图2 楮实子对DILI小鼠肝脏线粒体形态的影响(透射电镜,×7000)

Fig. 2 Effect of Broussonetiae Fructus on mitochondrial morphology of hepatocytes of DILI mice (TEM,×7000)

降低($P<0.05, P<0.01$)。见表4。

表3 楮实子对DILI小鼠血清SOD、MDA、T-AOC、GSH、GSSG和GSH-Px活性或含量的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Broussonetiae Fructus on activities or contents of SOD, MDA, T-AOC, GSH, GSSG and GSH-Px in serum of DILI mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	MDA/μmol·L ⁻¹	T-AOC/U·mL ⁻¹	GSH/g·L ⁻¹	GSSG/g·L ⁻¹	GSH-Px/U·mL ⁻¹
正常组		98.36±5.82	7.81±0.69	7.61±0.80	367.23±28.19	68.19±3.54	961.22±53.10
模型组		64.64±2.36 ¹⁾	11.83±1.23 ¹⁾	4.21±0.96 ¹⁾	223.81±34.80 ¹⁾	94.92±4.44 ¹⁾	733.69±42.78 ¹⁾
水飞蓟宾组	3.4	79.78±9.61 ²⁾	9.16±1.11 ²⁾	5.89±1.03 ²⁾	306.12±32.56 ³⁾	76.50±4.81 ³⁾	924.30±77.66 ³⁾
楮实子高剂量组	3.0	87.48±5.47 ³⁾	8.11±0.98 ³⁾	7.28±0.87 ³⁾	345.28±36.87 ³⁾	73.72±3.35 ³⁾	922.80±82.81 ³⁾
楮实子中剂量组	1.5	88.69±5.47 ³⁾	8.76±1.12 ²⁾	6.61±0.67 ²⁾	337.61±24.98 ³⁾	69.52±2.93 ³⁾	948.07±71.58 ³⁾
楮实子低剂量组	0.75	81.29±4.83 ²⁾	8.62±1.13 ²⁾	6.47±0.98 ²⁾	325.12±26.90 ³⁾	80.27±4.47 ²⁾	920.99±94.34 ³⁾

表4 楮实子对DILI小鼠肝组织SOD、MDA、T-AOC、GSH、GSSG和GSH-Px活性或含量的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Broussonetiae Fructus on SOD, MDA, T-AOC, GSH, GSSG and GSH-Px activities or contents in liver tissue of DILI mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	MDA/μmol·g ⁻¹	T-AOC/U·mg ⁻¹	GSH/mg·g ⁻¹	GSSG/mg·g ⁻¹	GSH-Px/U·mg ⁻¹
正常组		281.01±30.52	2.41±0.74	1.62±0.28	66.75±6.94	19.79±1.90	811.21±68.06
模型组		167.68±16.48 ¹⁾	3.93±1.00 ¹⁾	0.84±0.13 ¹⁾	41.94±3.38 ¹⁾	35.32±3.35 ¹⁾	622.16±62.20 ¹⁾
水飞蓟宾组	3.4	235.44±25.03 ²⁾	3.03±0.35 ²⁾	1.27±0.36 ²⁾	52.65±4.66 ²⁾	24.98±2.33 ²⁾	683.98±58.69
楮实子高剂量组	3.0	269.86±20.08 ³⁾	2.75±0.45 ³⁾	1.51±0.28 ³⁾	65.38±5.46 ³⁾	20.49±1.33 ³⁾	716.16±44.47 ³⁾
楮实子中剂量组	1.5	242.63±12.63 ²⁾	2.93±0.44 ³⁾	1.33±0.25 ²⁾	56.02±5.79 ²⁾	23.56±1.58 ²⁾	731.57±35.03 ³⁾
楮实子低剂量组	0.75	230.34±24.80 ²⁾	3.16±0.91 ²⁾	1.23±0.18 ²⁾	59.13±5.10 ²⁾	24.16±3.28 ²⁾	703.12±53.43 ²⁾

3.6 对DILI小鼠肝组织ATP含量的影响 与正常组比较,模型组小鼠肝组织ATP含量显著减少($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠肝组织中ATP含量增加($P<0.01$);与水飞蓟宾组比较,楮实子高、

中剂量组ATP含量显著升高,楮实子低剂量组ATP含量明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。见表5。

3.7 对DILI小鼠肝组织ROS表达的影响 荧光显

表 5 楮实子对 DILI 小鼠肝组织 ATP 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 5 Effect of Broussonetiae Fructus on activities of content of ATP in liver tissue of DILI mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ATP/μmol·g ⁻¹
正常组		1 678.41±105.70
模型组		964.09±98.23 ¹⁾
水飞蓟宾组	3.4	1 403.43±114.57 ³⁾
楮实子高剂量组	3.0	1 550.63±133.75 ³⁾
楮实子中剂量组	1.5	1 442.42±186.78 ³⁾
楮实子低剂量组	0.75	1 235.51±104.69 ²⁾

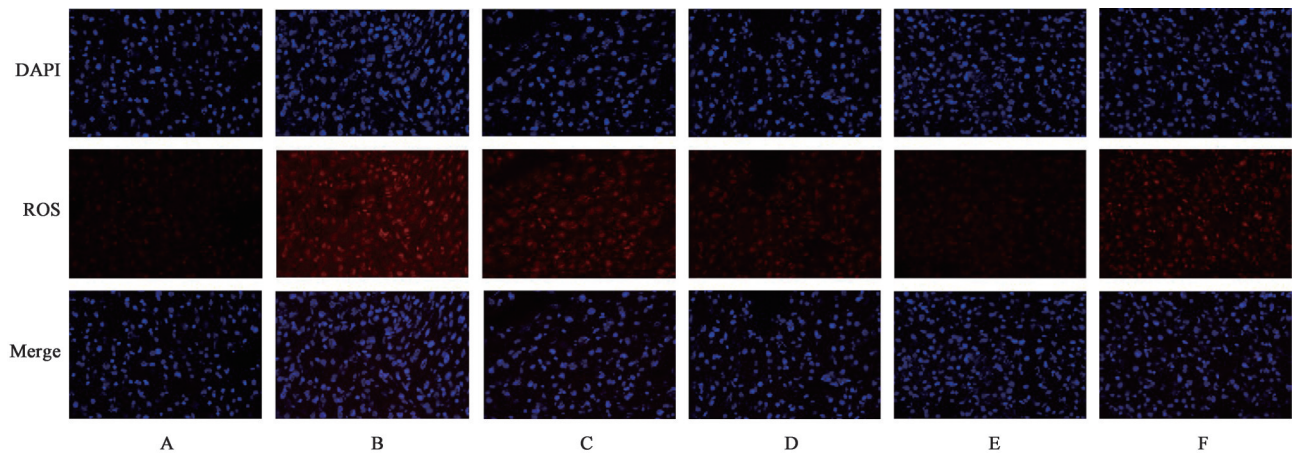


图 3 楮实子对 DILI 小鼠肝组织 ROS 表达的影响 (免疫荧光, ×400)

Fig. 3 Effect of Broussonetiae Fructus on ROS expression in liver tissue of DILI mice (IF, ×400)

表 6 楮实子对 DILI 小鼠肝组织 GRP78、CHOP、JNK mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Broussonetiae Fructus on GRP78, CHOP and JNK mRNA expressions in liver tissue of DILI mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GRP78	CHOP	JNK
正常组		0.68±0.06	0.82±0.11	1.00±0.07
模型组		1.88±0.13 ¹⁾	1.74±0.07 ¹⁾	1.89±0.06 ¹⁾
水飞蓟宾组	3.4	1.23±0.18 ³⁾	1.27±0.12 ²⁾	1.36±0.04 ²⁾
楮实子高剂量组	3.0	0.94±0.11 ³⁾	0.97±0.05 ³⁾	1.09±0.08 ³⁾
楮实子中剂量组	1.5	1.03±0.02 ³⁾	1.14±0.14 ³⁾	1.21±0.05 ³⁾
楮实子低剂量组	0.75	1.21±0.03 ³⁾	1.16±0.02 ³⁾	1.41±0.07 ²⁾

4 讨论

DILI 在中医古籍中可归属为“胁痛”“黄疸”“药毒”的范畴^[15], 其发病多因药毒由口而入, 随血入肝, 损伤肝体, 肝失疏泄, 肝病及脾, 脾失健运, 湿浊内生, 蕴积生热所致。故本病主要与肝脾二脏有关, 湿热毒蕴为其病机关键。清肝解毒, 利水祛湿乃有效治法。楮实子甘寒无毒, 具有清肝泄热, 解毒利湿之效, 契合 DILI 的病机, 且临床运用证实楮实子具有较好的保护肝功能、抗肝损伤作用^[16]。

显微镜下观察可见, 正常组小鼠肝组织 ROS 荧光强度微弱, 模型组荧光强度显著增强, 各给药组 ROS 荧光强度均明显降低。见图 3。

3.8 对 DILI 小鼠肝组织 GRP78、CHOP、JNK mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型组小鼠肝组织中 GRP78、CHOP、JNK mRNA 表达显著升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠肝组织中 GRP78、CHOP、JNK mRNA 表达明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 6。

APAP 是临床常用的非甾体类解热镇痛药, 该药物过量使用是导致急性肝损伤的常见原因。根据最新发布国际 DILI 临床诊疗指南和专家共识, ALT、AST、TBIL、DBIL 仍然是分析 DILI 的主要实验室指标^[17-18]。2015 年根据我国国情制定的 DILI 诊治指南中, 将生化指标作为治疗决策参考。因此研究药物的护肝作用首先应关注其对以上指标的干预作用^[19], 本实验结果表明, 模型组小鼠血清中 ALT、AST、TBIL、DBIL 含量或活性升高, 肝细胞肿胀、炎性细胞浸润及片状坏死; 生化指标中 ALT 升高最显著, 这与既往研究认为在 DILI 中血清 ALT 的上升较 AST 诊断价值更大相一致^[20], 以上结果提示 APAP 肝损伤模型复制成功。给予楮实子不同剂量后, 小鼠血清中 ALT、AST、TBIL、DBIL 含量或活性降低, 肝细胞肿胀、炎性浸润明显减轻, 未见坏死灶, 提示楮实子不同剂量对于 APAP 所致的肝损伤均具有保护作用。

研究表明, 氧化应激是 APAP 发病机制中的关键步骤^[21]。过量服用 APAP 后, 其产生的代谢产物 N-乙酰基-对苯醌亚胺 (NAPQI) 严重耗竭 GSH 后,

与蛋白巯基发生共价结合,形成蛋白加合物,从而诱发氧化应激及脂质过氧化反应^[22]。同时,GSH作为一种自由基清除剂,被耗竭后导致氧自由基蓄积,当超出机体氧化物清除能力时,则会影响肝脏的抗氧化体系,加重氧化应激^[23]。SOD和GSH-Px是抗氧化酶体系较为重要的两个酶,GSH-Px一方面可以清除体内的过氧化物,阻断氧自由基对机体的进一步损伤;另一方面可催化GSH被氧化为GSSG,而有研究显示GSSG是肝脏氧化损伤的重要标志,可诱导肝细胞死亡^[24-25]。SOD作为一种抗氧化因子,通过歧化方式将氧化物转化为H₂O₂,再经GSH转化为氧和水,从而发挥清除氧自由基的作用^[26]。MDA是脂质过氧化的终产物,通常用作氧化应激的生物指示剂,T-AOC是评价机体总抗氧化能力的指标。研究结果表明,APAP小鼠血清和肝组织中MDA含量和GSSG含量升高,GSH含量降低,T-AOC降低,SOD与GSH-Px活性降低,提示肝损伤后出现了氧化应激反应,抗氧化酶体系失衡;楮实子通过提高SOD、GSH-Px的活性,提高T-AOC活力,以降低血清和肝组织中MDA和GSSG含量,进而提高GSH含量,发挥抗氧化作用。

线粒体是ROS和自由基的主要生成场所,线粒体功能障碍会促使ROS和自由基的过度生成,造成细胞内氧化应激现象,甚至与氧化应激相互作用,进一步加重细胞损伤甚至凋亡^[27]。已有研究显示,线粒体是APAP诱导肝损伤的重要靶点,线粒体通透性改变(MPT)已经被证明是APAP毒性机制中的重要一环^[28]。过量的NAPQI可与线粒体膜蛋白结合,扰乱线粒体功能和ATP的生成,导致肝细胞坏死;线粒体中的合成酶和GSH与NAPQI结合后,又通过电子传递链抑制ATP合成^[29]。有证据表明,JNK的激活及易位至线粒体可引发一系列损伤信号扩增反应,改变细胞膜通透性^[30]。曹春等^[31]通过对大鼠分别腹腔注射JNK激活剂和抑制剂,发现注射激活剂后,弱化了治疗药物对急性肝损伤的保护作用;而注射抑制剂后,能明显改善肝损伤程度。有报道显示线粒体损失越多,APAP中毒患者存活率就越低,提示线粒体功能紊乱在APAP肝毒性机制中起到了主要作用^[32]。实验结果表明,楮实子一方面可修复受损的线粒体结构,提高ATP含量,恢复线粒体功能,从而抑制线粒体内ROS的生成,缓解氧化应激;另一方面可抑制JNK mRNA的表达,恢复双层膜结构,降低线粒体膜通透性,发挥护肝作用。

除线粒体外,内质网也是ROS的重要来源,且研究表明内质网能够产生凋亡的起始信号,然后再作用于线粒体引起电子传递链受扰,产生大量ROS^[33]。当细胞受到ROS攻击时,内质网膜受损,引起过量未折叠和(或)错误折叠的蛋白在内质网内聚集,损伤内质网的正常生理功能,从而引发内质网应激(ERS)^[34]。机体为了纠正ERS,未折叠和(或)错误折叠的蛋白和GRP78结合,激发未折叠蛋白反应(UPR),促进蛋白正确折叠,重建内质网稳态^[35]。因此,GRP78为ERS发生的标志蛋白。当机体的自身调节能力不足以抵抗ERS时,则会引发CHOP表达的增加导致促凋亡途径的激活,从而诱发细胞凋亡^[36]。研究结果表明,楮实子可通过降低GRP78和CHOP mRNA表达,缓解ERS及细胞凋亡的发生。

综上所述,楮实子抗APAP肝损伤的机制可能是通过降低GRP78、CHOP和JNK mRNA的表达,恢复机体的氧化还原平衡,缓解了线粒体与内质网应激而实现的。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 袁义朋. 药物性肝损伤的诊治与分析[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(1): 161.
- [2] 李晓芸, 唐洁婷. 药物性肝损伤的流行病学[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(11): 2510-2514.
- [3] SHEN T, LIU Y X, SHANG J, et al. Incidence and etiology of drug-induced liver injury in mainland China [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(8): 2230-2241.
- [4] MCGILL M R, JAESCHKE H. Animal models of drug-induced liver injury [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(5): 1031-1039.
- [5] 王帆, 朱弼瑞, 刘成海, 等. 对乙酰氨基酚致药物性肝损伤的分子机制[J]. 肝脏, 2021, 26(8): 939-942.
- [6] 杨海燕, 孙永康, 路永坤, 等. 岐黄学者王新志教授对单味中药楮实子的认识及临床应用[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(8): 1988-1990.
- [7] 顾袁圆, 陆明, 朱垚. 基于数据挖掘的周仲瑛教授运用黑料豆经验研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(20): 2172-2176.
- [8] 王进忠, 钟世杰, 杨荣源, 等. 岭南名医岑鹤龄养阴扶脾活络法论治慢性肝炎[J]. 广州中医药大学学报, 2017, 34(1): 123-125.
- [9] 吴兰芳, 张振东, 景永帅, 等. 楮实提取物体外抗氧化活性的研究[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(2): 184-186.

- [10] 王茜,张一听,石铖,等. 楮实子对药物性肝损伤大鼠氧化应激因子的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2019,31(9):1617-1623.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020.
- [12] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2011.
- [13] 于泽鹤,胡巍巍,巨晓宁,等. 解毒护肝方抑制NLRP3炎症小体活化缓解对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤[J]. 河北中医学报,2022,37(1):1-5.
- [14] 高绪聪,柴振海,张宗鹏. 药物性肝损伤的生物标志物及其评价的研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2012,26(5):692-696.
- [15] 章晨怡,茹清静. 浅议“药毒”与药物性肝损伤[J]. 中西医结合肝病杂志,2020,30(2):179-181.
- [16] 纪晓丽,张桐,闫丽珠. 李今垣运用楮实子汤治疗腹胀经验[J]. 湖南中医杂志,2016,32(8):25-26.
- [17] 聂晓璐,彭亚光,孙子墨,等. 药物性肝损伤诊断相关生化指标阈值制定的研究现状及思考[J]. 中国药物警戒,2022,19(3):244-247,258.
- [18] 于乐成,茅益民,陈成伟. 药物性肝损伤诊治指南[J]. 中华肝脏病杂志,2015,23(11):810-820.
- [19] CHALASANI N P, MADDUR H, RUSSO M W, et al. ACG clinical guideline: Diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury [J]. Am J Gastroenterol, 2021, 116(5): 878-898.
- [20] GREEN R M, FLAMM S. AGA technical review on the evaluation of liver chemistry tests [J]. Gastroenterology, 2002, 123(4): 1367-1384.
- [21] 余朋飞,吴桥,段钟平,等. 对乙酰氨基酚致药物性肝损伤的机制研究进展[J]. 临床肝胆病杂志,2019,35(9):2108-2112.
- [22] 李青霞,张玉彬. 对乙酰氨基酚损伤肝线粒体造成肝衰竭的分子机制及应用[J]. 药学进展,2019,43(10):786-792.
- [23] RIZVI F, MATHUR A, KAKKAR P. Morin mitigates acetaminophen induced liver injury by potentiating Nrf2 regulated survival mechanism through molecular intervention in PHLPP2-Akt-Gsk3 β axis [J]. Apoptosis, 2015, 20(10): 1296-1306.
- [24] PAPACKOVA Z, HECZKOVA M, DANKOVA H, et al. Silymarin prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice [J]. PLoS One, 2018, 13(1): e0191353.
- [25] 丁蕾,张福利,丁滨,等. GSSG通过抑制TNF- α 介导的NF- κ B活化诱导非酒精性肝损伤[J]. 浙江中医药大学学报,2016,40(9):696-701,709.
- [26] 刘小菊,雷新,张润峰. 氧化应激反应在冠心病发病中的作用研究进展[J]. 岭南心血管病杂志,2020,26(5):615-618.
- [27] SIMON J P, PARTHASARATHY M, NITHYANANDHAM S, et al. Protective effect of the ethanolic and methanolic leaf extracts of *Madhuca longifolia* against diclofenac-induced toxicity in female Wistar albino rats [J]. Pharmacol Rep, 2019, 71(6): 983-993.
- [28] HU J, LEMASTERS J J. Suppression of iron mobilization from lysosomes to mitochondria attenuates liver injury after acetaminophen overdose in vivo in mice: Protection by minocycline [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2020, 392: 114930.
- [29] CHEN D, NI H M, WANG L, et al. p53 up-regulated modulator of apoptosis induction mediates acetaminophen-induced necrosis and liver injury in mice [J]. Hepatology, 2019, 69(5): 2164-2179.
- [30] ZHANG J, MIN R W M, LE K, et al. The role of MAP2 kinases and p38 kinase in acute murine liver injury models [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(6): e2903.
- [31] 曹春,何凯明,陈伟,等. 富辛酸肠内营养通过抑制JNK诱导的肝细胞凋亡缓解脓毒症急性肝损伤[J]. 肠外与肠内营养,2021,28(5):262-266.
- [32] MCGILL M R, STAGGS V S, SHARPE M R, et al. Serum mitochondrial biomarkers and damage-associated molecular patterns are higher in acetaminophen overdose patients with poor outcome [J]. Hepatology, 2014, 60(4): 1336-1345.
- [33] MUELLER S, WEBER A, FRITZ R, et al. Sensitive and real-time determination of H₂O₂ release from intact peroxisomes [J]. Biochem J, 2002, 363(3): 483-491.
- [34] 周鑫,于睿,林萍. 参附汤通过Ca²⁺SERCA2a调控心力衰竭大鼠内质网应激改善心肌损伤研究[J]. 中华中医药学刊,2021,39(9):36-40,260-261.
- [35] 陈顺宏,黄汉飞,林杰,等. 内质网应激在肝脏疾病中的作用研究进展[J]. 胃肠病学和肝病杂志,2021,30(4):463-469.
- [36] YANG Q, GAO H, DONG R, et al. Sequential changes of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in myocardial fibrosis of diabetes mellitus-induced rats [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(6): 5037-5044.

[责任编辑 孙丛丛]