

八宝丹通过抑制NLRP3/Caspase-1通路减轻对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤

赵若玮¹, 张庆¹, 朱铭星², 刘跃洋³, 程再兴¹, 黄鸣清¹, 郑燕芳^{1*}, 林彦翔^{1*}

(1. 福建中医药大学药学院, 福州 350122; 2. 福建中医药大学中医学学院, 福州 350122;

3. 福建中医药大学针灸学院, 福州 350122)

[摘要] 目的:研究八宝丹(BBD)对对乙酰氨基酚(APAP)诱导的急性肝损伤小鼠NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3/胱天蛋白酶-1(NLRP3/Caspase-1)通路蛋白的影响。方法:将C57BL/6小鼠随机分组,BBD(75、150、300 mg·kg⁻¹)灌胃给药3 d,2次/d,于末次给药后2 h,腹腔注射APAP(400 mg·kg⁻¹),14 h后摘眼球取血,随后脱颈椎处死取材。苏木素-伊红(HE)染色法观察肝组织细胞形态学变化;生化法检测各组小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和髓过氧化物酶(MPO)的活性;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测小鼠肝脏中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)及白细胞介素-6(IL-6) mRNA表达水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠肝脏中环氧化酶-2(COX-2)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、NLRP3、Caspase-1、白细胞介素-18(IL-18)的蛋白表达水平。结果:与正常组比较,模型组小鼠肝脏组织小叶结构部分破坏、肝窦扩张,血清中ALT和AST水平,肝组织中NLRP3、Caspase-1、iNOS、IL-18、COX-2蛋白表达水平和IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA水平均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,各给药组小鼠肝细胞破裂现象有所好转,肝窦拥挤情况有所缓解,血清中ALT和AST水平,肝组织中NLRP3、Caspase-1、iNOS、IL-18、COX-2蛋白表达水平和IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA水平均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),并呈剂量依赖性。结论:BBD可减轻APAP诱导的小鼠急性肝损伤,其机制可能与抗氧化应激,抑制NLRP3/Caspase-1通路,进而降低IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、IL-6表达水平有关。

[关键词] 八宝丹;急性肝损伤;炎症因子;NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(MRP3);胱天蛋白酶-1(Caspase-1)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)05-0122-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20222001

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20221102.0918.002.html>

[网络出版日期] 2022-11-02 10:54:42

Babaodan Alleviates APAP-induced Acute Liver Injury in Mice by Inhibiting NLRP3/Caspase-1 Pathway

ZHAO Ruowei¹, ZHANG Qing¹, ZHU Mingxing², LIU Yueyang³, CHENG Zaixing¹,
HUANG Mingqing¹, ZHENG Yanfang^{1*}, LIN Yanxiang^{1*}

(1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Fuzhou 350122, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Fujian University of TCM, Fuzhou 350122, China;

3. College of Acupuncture and Moxibustion, Fujian University of TCM, Fuzhou 350122, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Babaodan (BBD) on the NOD-like receptor pyrin domain containing 3/cysteine aspartate-specific protease-3 (NLRP3/Caspase-1) pathway proteins in mice with acetaminophen (APAP)-induced acute liver injury. **Method:** C57BL/6 mice were randomly grouped, and BBD

[收稿日期] 2022-08-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81973437)

[第一作者] 赵若玮,在读硕士,从事中药药理研究,E-mail:824587601@qq.com

[通信作者] * 郑燕芳,博士,副教授,从事中药药理研究,Tel:0591-22861335,E-mail:yfzheng@fjtc.edu.cn;

* 林彦翔,博士,副教授,从事药用植物与分子生药研究,Tel:0591-22861283,E-mail:linyanxiang@fjtc.edu.cn

(75, 150, 300 mg·kg⁻¹, *ig*) was administered twice a day for three days. After 2 hours of the last administration, the mice were treated with APAP (400 mg·kg⁻¹, *ip*), and the eyeballs were removed to collect blood after 14 hours. Then they were sacrificed by cervical dislocation for sample collection. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the morphological changes of liver tissue cells, and biochemical methods were used to detect the activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and myeloperoxidase (MPO) in serum of mice in each group. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was performed to determine the mRNA expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6, and Western blot was performed to determine the protein expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), NLRP3, Caspase-1 and IL-18 in the liver of mice. **Result:** Compared with the conditions in normal group, the hepatic lobule structure of mice in the model group was partially destroyed, and the hepatic sinusoids were dilated. And the expression levels of ALT and AST in serum, the protein levels of NLRP3, Caspase-1, iNOS, IL-18 and COX-2 and the mRNA levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α were increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, the administration groups had improvement in liver cell rupture and hepatic sinusoidal compression, and a dose-dependent decrease in the levels of ALT and AST in serum as well as the protein levels of NLRP3, Caspase-1, iNOS, IL-18 and COX-2 and the the mRNA levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in liver tissue ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** BBD can reduce APAP-induced acute liver injury in mice. The mechanism may be related to anti-oxidative stress, inhibition of NLRP3/Caspase-1 pathway, and decreased expression levels of IL-1 β , IL-18, TNF- α and IL-6.

[Keywords] Babadon; acute liver injury; inflammatory factors; NOD-like receptor pyrin domain containing 3 (NLRP3); cysteine aspartate-specific protease-3 (Caspase-1)

急性肝损伤(ALI)是指由药物中毒、酒精摄入过多等各种不同诱因引起的,肝功能短期突发异常的疾病,急性肝损伤在我国的发病率呈逐年上升的趋势。严重的急性肝损伤还会转变为急性肝衰竭(ALF),导致肝细胞大量死亡,肝功能迅速恶化,病患死亡率极高。对乙酰氨基酚(APAP)别称扑热息痛,可以减少前列腺素E₁(PGE₁)的合成和释放,进而通过扩张外周血管来起到解热的效果,临床上常用于解热镇痛。然而,APAP存在于多种非处方的复方药物中,容易导致过量服用,如果日剂量超过4g就可致急性肝损伤,更大剂量会导致急性肝衰竭甚至死亡。APAP进入体内,小部分由细胞色素P4502E1(CYP2E1)代谢,形成活性毒性代谢产物N-乙酰基-对苯醌亚胺(NAPQI),NAPQI优先与肝脏中谷胱甘肽(GSH)结合形成无毒半胱氨酸和乙酰氨基酸衍生物,从而解除毒性。过量服用APAP会产生大量NAPQI,使肝脏中谷胱甘肽耗竭,再与肝细胞中蛋白质结合,导致肝细胞死亡。APAP过量服用还会刺激致炎因子和炎症介质的产生,从而进一步加重肝脏损伤。因而APAP成为诱发药物性急性肝损伤的主要原因之一^[1-2]。同时,临床上唯一使用的APAP解毒剂N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)具有

局限性,其治疗窗窄,对于APAP中毒超过24h的患者,NAC已经失去了解毒功能;并且NAC过量治疗还可能具有急性肾功能衰竭、溶血和血小板减少等不良反应。因此,探究APAP诱导的急性肝损伤的作用机制及为其寻找新的治疗方法十分有必要。

甘草酸二铵是中药甘草有效成分的第三代提取物,具有较强的抗炎、保护肝细胞膜及改善肝功能的作用,临床上广泛用于治疗伴有谷丙转氨酶升高的急、慢性肝炎。因此,本实验选取甘草酸二铵作为阳性药物。八宝丹是我国传统中药配方,由牛黄、麝香、三七、蛇胆、羚羊角、珍珠等中药组成,具有清利湿热,活血解毒,去毒止痛功效。现代研究表明,八宝丹具抗肝纤维化、抗炎、抗肿瘤等作用,临床上常用于肿瘤、肝胆疾病、免疫系统疾病、血液病及中医热证等方面的治疗^[3]。进一步调研发现,八宝丹对高脂肪饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病^[4]、酒精性肝损伤^[5]、病毒性肝损伤^[6]、肝性脑病^[7]均有较好的保护作用,但其对APAP诱导的急性肝损伤是否具有保护作用及具体作用机制还未见相关报道。因此,本实验试图探讨八宝丹对APAP诱导的小鼠急性肝损伤模型是否具有保护作用及其可能的作用机制,从而为临床治疗APAP中毒和急

性肝损伤提供依据和新的治疗手段。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性C57BL/6小鼠购自吴氏实验动物责任有限公司(动物合格证号20210601Abzz0100000447),48只,体质量(20±2)g,6~8周龄,合格证号SCXK(浙)2019-2020。将小鼠饲养于福建中医药大学实验动物中心SPF级屏障环境中,小鼠自由进食及饮水,动物实验部分满足福建中医药大学实验动物福利伦理委员会的要求(批准文号2021017)。

1.2 药品及试剂 八宝丹胶囊(厦门中药厂有限公司,批号210801-060);甘草酸二铵胶囊(南京正大天晴制药有限公司,批号210107402);APAP(上海源叶生物科技有限公司,批号H17011Z127515);丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(ASL)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、髓过氧化物酶(MPO)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20220411、20220317、20220308、20220321、20220302);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号G1120);二甲苯、无水乙醇(西陇科学有限股份公司,批号分别为1802012、2009169);多聚甲醛(上海麦克林生化科技有限公司,批号22011938);BCA蛋白浓度检测试剂盒、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为092721220221、041922220429);Cham™ SYBR®实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Master Mix(南京Vazyme公司,批号7E560E1);逆转录试剂盒、蛋白质预染Marker(美国Thermo Fisher公司,批号分别为00970909、1018011021);胱天蛋白酶-1(Caspase-1)抗体(美国Santa Cruz公司,批号E2920);环氧化酶-2(COX-2)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、白细胞介素-18(IL-18)抗体(英国Abcam公司,批号分别为191860、18985-1-AP、12375-1-AP);β-肌动蛋白(β-actin)抗体(北京全式金生物公司,批号P31029);NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NCRP3)抗体(美国CST公司,批号15101s);鼠二抗、兔二抗(武汉三鹰生物技术公司,批号分别为20000312、20000483);RNA isolater Total RNA Extraction Reagent(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,货号R401-01)。

1.3 仪器 BT224S型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);30174782型多功能酶标仪(美国BioTek公

司);HM325型石蜡切片机(美国Thermo Fisher公司);552BR138222型电泳仪、71BR13865型化学发光成像仪(美国Bio-Rad公司);7900H型Real-time PCR仪(美国Applied Biosystems公司)。

2 方法

2.1 药物制备 将八宝丹磨至粉末状,称取一定量粉末,加入2%聚山梨酯-80作为助溶剂,制备成7.5、15、30 g·L⁻¹的混悬液备用;称取适量APAP于生理盐水中,55℃水浴加热至完全溶解,配制成40 g·L⁻¹的溶液,现用现配。

2.2 分组及给药 将48只SPF级雄性C57BL/6小鼠随机分为6组(每组8只):正常组、APAP模型组、甘草酸二铵组(60 mg·kg⁻¹)、八宝丹低(75 mg·kg⁻¹)、中(150 mg·kg⁻¹)、高(300 mg·kg⁻¹)剂量组,按10 mL·kg⁻¹的剂量灌胃给药,每隔12 h给药1次,共给药6次,给药剂量是参考临床等效剂量换算而来,八宝丹胶囊的服用剂量是成人1次0.6 g,每天2~3次,按照1日3次,成人体质量按60 kg计算,小鼠和人的给药剂量换算系数按照12.3来计算,得出最大给药量是369 mg·kg⁻¹,因此高剂量组定为300 mg·kg⁻¹。末次给药2 h后,腹腔注射APAP(400 mg·kg⁻¹),剂量为10 mL·kg⁻¹,造模14 h后取材,正常组和模型组灌胃给予相应体积的生理盐水。

2.3 HE染色观察小鼠肝脏组织病理学变化 取血后脱颈椎处死小鼠,开腹摘取小鼠肝脏组织,用生理盐水冲洗净表面残留血液并用滤纸擦拭干净后,取同一部位大小相等的肝组织置于多聚甲醛中,经过脱水、石蜡包埋、切片,HE染色等步骤后观察肝脏病理变化。

2.4 小鼠肝功能指标的测定 造模结束后,小鼠摘眼球取血,获得血液样本。血液样本室温静置30 min以上,3 000 r·min⁻¹(离心半径7.7 cm,下同)离心10 min,然后取上清液得到血清样本。然后按照试剂盒说明书进行操作,于510 nm处检测各孔吸光度A,再根据标准曲线计算各组血清中ALT和AST水平。

2.5 小鼠肝脏氧化应激指标的测定 称取肝组织质量100 mg,按质量(g)-体积(mL)1:9的比例加入9倍体积的生理盐水,剪碎组织块,冰水浴制备匀浆,于3 500 r·min⁻¹,4℃离心10 min,取上清液制得10%匀浆待用。再根据试剂盒方法步骤检测各组小鼠肝脏组织中SOD、MDA、MPO的水平。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测炎症因子蛋白的表达程度 运用蛋白质印迹法检测小鼠肝

脏中炎症蛋白酶 COX-2、iNOS、NLRP3、Caspase-1、IL-18、 β -actin(稀释比例分别为 1:2 000、1:750、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:5 000)的蛋白表达水平。将各组小鼠肝脏研磨后,取肝脏样品 100 mg 左右,加入 RIPA 裂解液 1 mL 进行组织匀浆,于冰上操作,充分研磨后,于 $14\ 000\ r\cdot\min^{-1}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 离心 10 min,取上清;BCA 法检测制备好的上清的蛋白浓度,然后加入 Loading Buffer 和稀释液将不同组的蛋白样品调制同一浓度, $100\ ^\circ\text{C}$ 加热样本 10 min 直至蛋白变性。每组取蛋白样品 $40\ \mu\text{g}$ 左右,使用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离目标蛋白,再将蛋白转至 PVDF 膜,然后置于 5% 脱脂奶粉中封闭 1.5 h,封闭结束后用 0.5% TBST 洗涤 3 次,每次 3 min,然后加入一抗 $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育过夜,第 2 天再用 0.5% TBST 洗涤 3 次后室温孵育二抗 1.5 h。最后用 ECL 化学发光底物进行曝光显影,并使用 Image Lab 软件分析条带。

2.7 Real-time PCR 检测炎症因子 mRNA 的表达程度 运用 Real-time PCR 法检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达水平。取小鼠肝组织 50~100 mg,加入 TRIzol 1 mL,用 1 mL 注射器反复抽提至均匀混悬,再依次加入三氯甲烷、异丙醇、75% 乙醇并分别于 $12\ 000\ r\cdot\min^{-1}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 离心后获得 RNA 样本,使用紫外分光光度仪器测量 RNA 浓度,按照说明书要求配置逆转录体系,于逆转录仪器上制得 cDNA 样本。按照说明书配置 PCR 反应体系(DEPC 水 $2\ \mu\text{L}$ 、Mix $5\ \mu\text{L}$ 、上下游引物各 $1\ \mu\text{L}$ 、cDNA $1\ \mu\text{L}$)。PCR 扩增反应条件为 $95\ ^\circ\text{C}$ 预变性 30 s, $95\ ^\circ\text{C}$ 变性 10 s, $60\ ^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 40 个循环。相应引物序列见表 1(由沃森生物科技有限公司设计合成)。本研究使用相对定量方法,应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析数据。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
TNF- α	上游 GCCGATGGGTTGTACCTTGT	139
	下游 TCTTGACGGCACAGAGGAGG	
IL-1 β	上游 GAAATGCCACCTTTTGACAGTG	116
	下游 TGGATGCTCTCATCAGGACAG	
IL-6	上游 CTGCAAGAGACTTCCATCCAG	131
	下游 AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG	
β -actin	上游 GAGCGCAAGTACTCTGTGTG	152
	下游 AACGCAGCTCAGTAACAGTC	

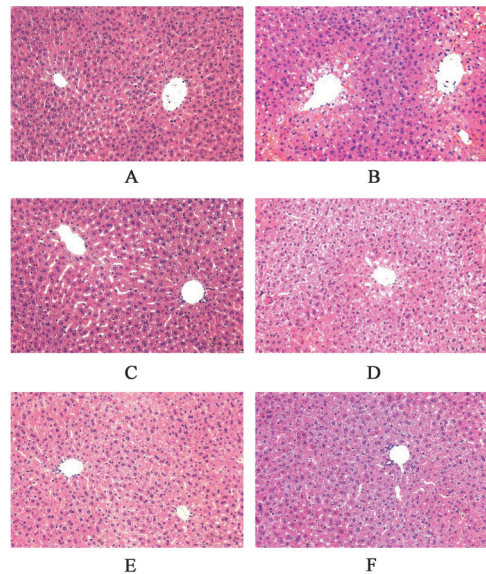
2.8 统计学方法 采用 SPSS 26.0 对实验结果进行统计处理,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据呈正态分布且方差齐时,采用单因素方差分析;不符合正态分

布或方差不齐时,采用非参数检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 APAP 诱导的小鼠肝脏病理变化的影响

HE 结果表明,正常组肝小叶结构清晰,肝细胞索围绕中央静脉向四周呈放射状排列,肝窦无明显扩张或挤压,肝细胞排列紧密,肝细胞大小均一,细胞核清晰可见;模型组可见肝血窦明显受压变窄,部分肝细胞结构被破坏、出现脂肪空泡;甘草酸二铵组、八宝丹低、中、高治疗组肝细胞破裂现象有所好转,肝血窦挤压情况有所缓解,并且八宝丹高、中剂量组损伤程度较低剂量组减轻。见图 1。



注:A.正常组;B.模型组;C.甘草酸二铵组;D.八宝丹低剂量组;E.八宝丹中剂量组;F.八宝丹高剂量组

图 1 八宝丹(BBD)对 APAP 诱导的小鼠肝脏病理变化的影响(HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of Babaodan (BBD) on pathological changes of APAP-induced C56BL/6 mice (HE, $\times 200$)

3.2 对 APAP 诱导的 C56BL/6 小鼠肝脏中 ALT、AST 水平的影响

与正常组比较,APAP 处理后可造成模型组小鼠肝功能指标 AST 和 ALT 水平显著上升 ($P < 0.01$);与模型组比较,八宝丹低剂量组的 ALT 和 AST 水平明显下降 ($P < 0.05$),八宝丹中、高剂量组的 ALT 和 AST 水平降低更为显著 ($P < 0.01$)。见表 2。

3.3 对急性肝损伤小鼠肝脏中 SOD、MDA、MPO 水平的影响

与正常组比较,APAP 处理后可造成模型组小鼠氧化应激指标 MDA、MPO 水平明显上升 ($P < 0.05$),抗氧化应激 SOD 水平显著下降 ($P < 0.01$);与模型组比较,不同剂量八宝丹治疗均可明

表2 BBD对APAP诱导的C56BL/6小鼠肝脏中ALT、AST水平的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of BBD on ALT and AST levels in liver of APAP-induced C56BL/6 mice ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ALT	AST
正常组		24.18±12.18	4.12±3.38
模型组		146.70±41.75 ²⁾	100.60±32.00 ²⁾
甘草酸二铵组	60	51.31±11.46 ⁴⁾	36.24±11.37 ⁴⁾
八宝丹低剂量组	75	83.56±31.66 ³⁾	48.52±17.46 ³⁾
八宝丹中剂量组	150	20.05±9.91 ⁴⁾	6.68±5.09 ⁴⁾
八宝丹高剂量组	300	11.31±7.58 ⁴⁾	14.23±10.87 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表3-表5同)

显降低肝脏中MDA、MPO水平,升高SOD水平($P<0.05, P<0.01$),并呈现剂量依赖性。见表3。

表3 BBD对APAP诱导的C56BL/6小鼠肝脏中SOD、MDA、MPO水平的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effect of BBD on levels of SOD, MDA and MPO in liver of APAP-induced C56BL/6 mice ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	MDA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	MPO/U·g ⁻¹
正常组		306.50±55.61	0.58±0.48	0.86±0.37
模型组		237.30±28.07 ²⁾	1.72±1.30 ¹⁾	1.69±1.17 ¹⁾
八宝丹低剂量组	75	258.60±44.99	1.13±1.18	1.16±0.70
八宝丹中剂量组	150	261.60±63.81	0.75±0.40 ³⁾	0.81±0.13 ³⁾
八宝丹高剂量组	300	301.90±51.71 ³⁾	0.60±0.21 ³⁾	0.74±0.21 ⁴⁾

表4 BBD对APAP诱导的C56BL/6小鼠肝脏中IL-1 β 、IL-6和TNF- α mRNA水平的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Effect of BBD on mRNA levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in liver of APAP-induced C56BL/6 mice ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	IL-1 β	IL-6	TNF- α
模型组		10.44±5.30 ²⁾	8.02±5.89 ¹⁾	2.47±1.11 ¹⁾
八宝丹低剂量组	75	2.01±0.56 ⁴⁾	5.20±1.05	1.23±0.12 ³⁾
八宝丹中剂量组	150	1.51±0.74 ⁴⁾	3.14±0.78 ³⁾	0.63±0.06 ³⁾
八宝丹高剂量组	300	1.31±0.48 ⁴⁾	0.88±0.22 ⁴⁾	0.79±0.09 ³⁾

注:设正常组各指标的mRNA相对表达量均为1

表5 BBD对APAP诱导的C56BL/6小鼠肝脏中NLRP3、Caspase-1、IL-18、COX-2、iNOS蛋白水平的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 5 Effect of BBD on expression of NLRP3, Caspase-1, IL-18, COX-2 and iNOS in liver of APAP-induced C56BL/6 mice ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	NLRP3/ β -actin	Caspase-1/ β -actin	IL-18/ β -actin	COX-2/ β -actin	iNOS/ β -actin
模型组		1.20±0.11 ¹⁾	3.70±2.41 ¹⁾	1.15±0.34 ²⁾	1.42±0.21 ¹⁾	1.41±0.15 ¹⁾
八宝丹低剂量组	75	0.77±0.12 ⁴⁾	1.28±0.32 ³⁾	1.04±0.57 ³⁾	1.17±0.18	1.39±0.25
八宝丹中剂量组	150	0.69±0.81 ⁴⁾	1.33±0.48 ³⁾	0.90±0.08 ⁴⁾	0.81±0.16 ⁴⁾	1.37±0.17
八宝丹高剂量组	300	0.70±0.02 ⁴⁾	1.10±0.74 ³⁾	0.74±0.08 ⁴⁾	0.74±0.14 ⁴⁾	1.09±0.19 ³⁾

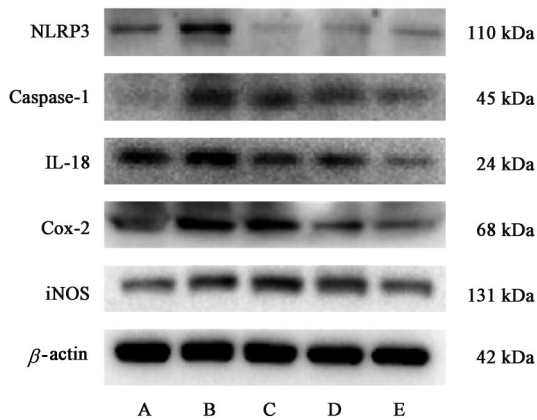
注:设正常组各指标的蛋白相对表达量均为1

4 讨论

炎症小体是天然免疫系统的重要组成部分,也是参与炎症的关键调节因子,与肝脏疾病的发生密切相关。NLRP3炎症小体是多种蛋白质组成的复

合体,由NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)及半胱天蛋白酶-1前体(pro-Caspase-1)组成。当NLRP3感应到信号时,ASC结构域会作为桥梁连接pro-Caspase-1和NLRP3,进而聚集成NLRP3炎性小

3.4 对急性肝损伤小鼠肝脏中促炎因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠肝脏中IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA水平明显升高($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,低、中、高剂量八宝丹治疗明显降低肝脏中IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA水平($P<0.05, P<0.01$)。见表4。
3.5 对急性肝损伤小鼠肝脏中NLRP3/Caspase-1信号通路相关蛋白表达的影响 与正常组比较,APAP刺激14 h后,小鼠肝脏中NLRP3、Caspase-1、IL-18、COX-2、iNOS的蛋白表达水平均明显增加($P<0.05, P<0.01$)。与模型组比较,不同剂量八宝丹治疗组均可以降低小鼠肝脏中NLRP3、Caspase-1、IL-18、COX-2、iNOS蛋白表达水平($P<0.05, P<0.01$),且呈剂量依赖性。见表5和图2。



注:A.正常组;B.模型组;C.八宝丹低剂量组;D.八宝丹中剂量组;E.八宝丹高剂量组

图2 各位小鼠肝脏中NLRP3/Caspase-1信号通路相关蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of NLRP3/Caspase-1 signal pathway related proteins expression in liver of each groups

体,激活的NLRP3炎症小体可以进一步将pro-Caspase-1切割为有活性的Caspase-1,该分子可以促进产生促炎因子IL-1 β 、TNF- α 、IL-6和IL-18分泌。IL-1 β 、TNF- α 和IL-6是炎症损伤过程中重要的炎症因子,可以参与炎症信号网络的启动和放大炎症反应的损伤,诱导机体内炎症的发生^[7]。已有研究表明,NLRP3炎症小体的活化是APAP诱导急性肝损伤的重要机制之一^[8]。研究结果显示,经过APAP造模后,小鼠肝脏中肝血窦明显受压变窄,部分肝细胞破裂、细胞核移位,同时小叶周围还出现脂肪空泡;小鼠血清中ALT、AST水平明显升高;同时,模型小鼠肝组织中NLRP3、Caspase-1及IL-18的蛋白水平显著上升,促炎因子IL-1 β 、TNF- α 和IL-6的mRNA水平明显上升,经不同剂量八宝丹干预后,小鼠肝细胞破裂现象好转,肝血窦被挤压的情况有所缓解,血清中ALT、AST水平明显下降,肝脏组织中NLRP3、Caspase-1及IL-18的蛋白水平明显下降,并且IL-1 β 、TNF- α 和IL-6的mRNA水平明显下降,表明八宝丹可能通过调控NLRP3/Caspase-1通路,抑制炎症反应,进而发挥抗急性肝损伤作用。

此外,激活的NLRP3炎症小体还会促进促炎介质COX-2和iNOS的分泌。COX-2是调控前列腺素的一种酶,当细胞受到炎症刺激时,表达水平迅速升高,引起炎症部位PGE₁的升高,从而导致炎症反应^[9]。而iNOS能催化合成大量的NO以参与炎症反应,从而加重炎症损伤^[10]。本研究结果显示,在APAP造模后,小鼠肝脏组织中的COX-2和iNOS蛋白表达量升高,而八宝丹干预可以显著抑制模型小

鼠肝脏中COX-2和iNOS的表达,进一步证实了八宝丹对APAP所致急性肝损伤过程中的抗炎作用。

氧化应激(OS)是指体内氧化与抗氧化作用失衡的一个病理过程。氧化应激状态下,活性氧(ROS)大量积累,一方面可以直接导致细胞和组织氧化损伤;另一方面,ROS可以激活NLRP3炎症小体,放大炎症反应,从而间接对细胞和组织造成损伤^[11]。研究表明,氧化应激是APAP发病机制中的关键步骤^[12]。过量服用APAP后,其有毒代谢产物NAPQI会严重耗竭GSH,从而产生肝毒性,并诱发氧化应激及脂质过氧化反应。SOD是生物体内清除自由基的首要物质,在机体氧化与抗氧化平衡中起到至关重要的作用。MDA是膜脂过氧化的最终产物,可以与蛋白质和核酸反应,使之丧失功能,从而对细胞造成损伤,其表达水平是细胞衰老与死亡的直观指标。MPO是中性粒细胞的功能标志和激活标志,主要功能是在吞噬细胞内杀灭微生物,在特定条件下,MPO催化反应生成过量的氧化剂,超过局部抗氧化剂的防御反应时,就会导致氧化应激和氧化性组织损伤。本研究结果显示,在APAP造模后,MDA、MPO水平上升,SOD水平下降。经不同剂量八宝丹干预后,MDA、MPO水平下降,SOD水平上升,表明八宝丹可以缓解APAP诱导的氧化应激损伤,进而减轻NLRP3造成的炎症损伤。

综上所述,BBD可减轻APAP诱导的小鼠急性肝损伤,改善肝细胞破裂情况,缓解肝血窦的挤压现象,降低血清ALT、AST水平,并且其肝保护作用可能是通过抗氧化应激,抑制NLRP3/Caspase-1通路,进而降低IL-1 β 、TNF- α 、IL-6和IL-18的表达水平,同时降低炎症蛋白酶COX-2和iNOS的表达来发挥作用的。

APAP是临床最常用的解热镇痛抗炎药,也是临床引起肝毒性的最常见的药物。同时,临床上唯一使用的APAP解毒剂NAC又具有局限性,因此,为其寻求有效且不良反应小的治疗手段十分必要。有研究表明,蒲公英叶水提取物能通过调控炎症因子和细胞凋亡来对APAP诱导的大鼠肝损伤发挥保护作用^[14];还有研究表明,肠道共生真菌可以通过减少小鼠中Cyp2a5的表达来抑制APAP诱导的肝毒性^[15]。不过目前还没有应用于临床的有效手段。八宝丹是我国传统中药配方,具有清利湿热,活血解毒,去毒止痛功效。现代研究表明,八宝丹能通过激活Nrf2和自噬来缓解乙醇诱导的急性肝损伤^[16];但其对APAP诱导的急性肝损伤是否具有保

护作用及具体作用机制还未见相关报道。因此,本实验探讨了八宝丹对APAP诱导的小鼠急性肝损伤模型的保护作用,希望能为临床治疗APAP中毒和急性肝损伤提供一些依据和新的治疗手段。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] CHOMCHAI S, MEKAVUTHIKUL P, PHUDITSHINNAPATRA J, et al. Sensitivity of dose-estimations for acute acetaminophen overdose in predicting hepatotoxicity risk using the Rumack-Matthew Nomogram [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2022,10(1):e00920.
- [2] DEVARBHAVI H, AITHAL G, TREEPRASERTSUK S, et al. Drug-induced liver injury: Asia pacific association of study of liver consensus guidelines [J]. *Hepatol Int*, 2021, 15(2):258-282.
- [3] 黄彬,白雪松,彭军,等. 八宝丹基础和临床应用研究进展[J]. *福建中医药*, 2018, 49(1):83-85, 88.
- [4] SHENG D, ZHAO S, GAO L, et al. BabaoDan attenuates high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease via activation of AMPK signaling [J]. *Cell Biosci*, 2019, 9:77.
- [5] YU Y, TIAN Z Q, LIANG L, et al. Babao Dan attenuates acute ethanol-induced liver injury via Nrf2 activation and autophagy [J]. *Cell Biosci*, 2019, 9:80.
- [6] YANG H X, GOU J, HUANG P, et al. Babaodan Capsules for viral hepatitis: Systematic review of clinical efficacy and safety and Meta-analysis of randomized clinical trials [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 2019, 44(22):4953-4961.
- [7] LU L, WU C, LU B J, et al. BabaoDan cures hepatic encephalopathy by decreasing ammonia levels and alleviating inflammation in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 249:112301.
- [8] ZAHID A, LI B, KOMBE A, et al. Pharmacological inhibitors of the NLRP3 inflammasome [J]. *Front Immunol*, 2019, 10:2538.
- [9] SHAN S, SHEN Z, ZHANG C, et al. Mitophagy protects against acetaminophen-induced acute liver injury in mice through inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 169:113643.
- [10] CUI J, JIA J. Natural COX-2 inhibitors as promising anti-inflammatory agents: An update [J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28(18):3622-3646.
- [11] HICKEY M J, GRANGER D N, KUBES P. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and regulation of leucocyte/endothelial cell interactions: Studies in iNOS-deficient mice [J]. *Acta Physiol Scand*, 2001, 173(1):119-126.
- [12] ABAIS J M, XIA M, ZHANG Y, et al. Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector? [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 22(13): 1111-1129.
- [13] 王帆,朱翊瑞,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.
- [14] WANG L, ZHANG L, WANG J, et al. Protective effect of dandelion leaf water extracts on APAP-induced liver injury in rats and its mechanism [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2022, 68(5):24-33.
- [15] HE Z, ZENG Y, LI S, et al. Gut commensal fungi protect against acetaminophen-induced hepatotoxicity by reducing Cyp2a5 expression in mice [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13:944416.
- [16] YU Y, TIAN Z Q, LIANG L, et al. Babao Dan attenuates acute ethanol-induced liver injury via Nrf2 activation and autophagy [J]. *Cell Biosci*, 2019, 9:80.

[责任编辑 周冰冰]