

川芎嗪通过 AMPK/SIRT1 通路介导的自噬在急性肝衰竭中的作用及其机制研究

吾斯曼·艾海提, 买尔旦·米吉提, 唐国华, 艾则孜江·艾尔肯*

新疆医科大学第一附属医院 药学部, 新疆 乌鲁木齐 830054

摘要: 目的 探讨川芎嗪对脂多糖 (LPS) /D-氨基半乳糖 (D-GalN) 诱导的急性肝衰竭小鼠的作用及其机制。方法 将 C57BL/6J 小鼠随机分对照组、模型组、川芎嗪组、川芎嗪联合 SIRT1 抑制剂 (EX527) 组, 每组 10 只。通过 ip LPS/D-GalN 构建急性肝衰竭小鼠模型, 检测血清中天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 的水平; 苏木精-伊红 (HE) 染色检测肝组织病理学变化; 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测肝组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6)、IL-1 β 和环氧化酶-2 (COX-2) mRNA 水平; 检测肝组织中氧化应激因子谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 含量; Western blotting 检测肝组织中沉默调节蛋白 1 (SIRT1)、磷酸化单磷酸腺苷活化蛋白激酶 α (p-AMPK) α /AMPK α 蛋白和自噬相关蛋白人微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) -II/LC3-I、p62 的水平。结果 与模型组比较, 川芎嗪组小鼠血清 ALT 和 AST 水平均显著降低, 肝细胞坏死区域以及炎症细胞浸润明显减少, 肝组织中 MDA、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、COX-2 mRNA 和 p62 蛋白水平均显著降低, SOD、GSH、SIRT1、p-AMPK α /AMPK α 、LC3-II/LC3-I 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$)。EX527 处理后显著逆转了川芎嗪对急性肝衰竭小鼠的作用。结论 川芎嗪通过抑制 LPS/D-GalN 诱导的急性肝衰竭小鼠炎症反应发挥肝脏保护作用, 其机制可能与 AMPK/SIRT1 信号通路和自噬有关。

关键词: 川芎嗪; 急性肝衰竭; 单磷酸腺苷活化蛋白激酶/沉默调节蛋白 1 信号通路; 自噬; 天冬氨酸氨基转移酶; 丙氨酸氨基转移酶; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-6; 微管相关蛋白 1 轻链 3

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)11-2423-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.11.002

Effect and mechanism of ligustrazine in acute liver failure mediated by AMPK/SIRT1 pathway

WUSIMAN Aihaiti, MAIERDAN Mijiti, TANG Guo-hua, AIEZEZIJANG Aierken

Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

Abstract: Objective To investigate the effect of ligustrazine on lipopolysaccharide (LPS)/D-galactose (D-GalN) - induced acute liver failure in mice, and its mechanism. **Methods** C57BL/6J mice were randomly divided into control group, model group, ligustrazine group, and ligustrazine + SIRT1 inhibitor (EX527) group, each group had 10 mice. The mice model of acute liver failure was established by ip LPS/D-GalN, and the serum levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were detected in each group. Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to detect the pathological changes of liver tissue in each group. mRNA levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6, IL-1 β , and cyclooxygenase-2 (COX-2) in liver tissue of each group were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR). Contents of oxidative stress factors glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) in liver tissue were detected. Western blotting was used to detect the levels of silencing regulatory protein 1 (SIRT1), phosphorylated adenosine monophosphate activated protein kinase (p-AMPK) α /AMPK α protein and autophagy-related proteins human microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) -II/LC3-I and p62 in liver tissue of mice in each group. **Results** Compared with the model group, the serum levels of ALT and AST in ligustrazine group were significantly decreased, the necrosis area of hepatocytes and the infiltration of inflammatory cells were significantly decreased, and the mRNA and protein levels of MDA, TNF- α , IL-6, IL-1 β , and COX-2 in liver tissue were significantly decreased. Protein levels of

收稿日期: 2022-06-21

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (2021D01C082)

作者简介: 吾斯曼·艾海提, 男, 研究方向为药理学。E-mail: l8119x@163.com

*通信作者: 艾则孜江·艾尔肯, 在读博士, 研究方向为天然药物。

SOD, GSH, SIRT1, P-AMPK α /AMPK α , and LC3-II/LC3-I were significantly increased ($P < 0.05$). EX527 treatment significantly reversed the effect of ligustrazine on acute liver failure mice. **Conclusion** Ligustrazine exerts hepatic protection by inhibiting the inflammatory response in acute liver failure mice induced by LPS/*D*-GalN, and its mechanism may be related to AMPK/SIRT1 signaling pathway and autophagy.

Key words: ligustrazine; acute liver failure; AMPK/SIRT1 signaling pathway; autophagy; AST; ALT; autophagy; TNF- α ; IL-6; LC3

急性肝衰竭以炎症介导的肝细胞损伤为特征,常伴有肝细胞凋亡和坏死。它是由肝炎病毒、肝毒性药物和肝脏缺血再灌注损伤等多种因素引起的,临床表现为起病急、进展快、病死率高^[1]。自 1983 年以来,肝移植被认为是治疗急性肝衰竭最有效的方法^[2]。然而,随着生活水平的不断提高,急性肝衰竭的发病率也在逐年增加。因此,等待移植的患者数量与器官供应之间的差距正在扩大,迫切需要开发一种替代肝移植的治疗方法。脂多糖(LPS)联合 *D*-氨基半乳糖(*D*-GalN)常被用于建立肝功能衰竭的动物模型,其特征是激活核因子(NF)- κ B 和过度分泌炎症细胞因子导致全身炎症反应^[3]。越来越多的证据表明,各种促炎细胞因子/介质参与 LPS/*D*-GalN 诱导的肝毒性,如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、环氧化酶-2(COX-2)^[4]。因此,抑制炎症反应可能是治疗肝功能衰竭的一种方法。单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)是参与能量代谢调节的重要激酶,在肝损伤急性期起保护作用^[5]。沉默调节蛋白 1(SIRT1)是一种依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)的组蛋白去乙酰化酶,是能量代谢的主要调节因子,也是细胞存活的重要组成部分^[6]。此外,一些报道表明自噬激活抑制促炎因子的产生,在缓解特定炎症疾病的症状中发挥重要作用^[7]。自噬在真核细胞中广泛存在,通常被认为是一种细胞保护机制,以维持细胞稳态和防止不利应激条件下的生物损伤。越来越多的证据也表明,自噬在维持肝脏稳态方面起着重要作用。在某些肝脏病理过程中也发现了自噬相关蛋白的异常表达,如脂肪肝、病毒性肝炎和肝癌等,表明自噬在肝细胞损伤和修复中具有重要作用^[8]。此外,研究发现自噬与急性肝衰竭动物模型有关^[9]。川芎嗪是一种从川芎中提取的生物碱,具有抗氧化、抗纤维化、抗炎和抗肿瘤等多种作用。此前有报道表明,川芎嗪通过核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)/缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)通路依赖机制减轻酒精诱导的肝脏脂肪变性^[10]。然而,川芎嗪在急性肝衰竭的作用及其机制仍有待充分阐明。因此,本研究采用 LPS/*D*-GalN 诱导急性肝衰竭小鼠

模型,探讨川芎嗪通过调控 AMPK/SIRT1 信号通路和自噬在急性肝衰竭中的作用。

1 材料

1.1 实验动物

雄性 C57BL/6J 小鼠,6~8 周龄,体质量 18~20 g,由新疆维吾尔自治区实验动物研究中心提供,合格证编号 SYXK(新)2019-0002。所有动物均饲养在温度为(24 \pm 1) $^{\circ}$ C、相对湿度 45%~65%、12 h 光照/12 h 黑暗循环的动物房中,可自由获取水和食物。所有动物实验均经本院伦理委员会批准,动物实验伦理审查号 2020-0076。

1.2 主要试剂仪器

川芎嗪(质量分数 \geq 98%,批号 200809E2)购自哈尔滨三联药业有限公司;LPS(批号 L9641)、*D*-GalN(批号 G1639)均购自 Sigma-Aldrich 公司;丙二醛(MDA,批号 20200417)、超氧化物歧化酶(SOD,批号 20200425)、谷胱甘肽(GSH,批号 20200508)、天冬氨酸氨基转移酶(AST,批号 20200718)、丙氨酸氨基转移酶(ALT,批号 20200624)检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所有限公司;SIRT1 抑制剂(EX-527,批号 HZ0281)购自上海沪震实业有限公司;苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(批号 G1120)购自北京索莱宝科技有限公司;反转录试剂盒 PrimeScript RT Master Mix(批号 RR036A)、PCR 试剂盒 SYBR Premix Ex Taq(批号 RR420A)购自宝生物工程(大连)有限公司;兔抗 SIRT1 抗体(批号 2496S)、兔抗 AMPK α 抗体(批号 2603P)、兔抗 p-AMPK α 抗体(批号 4188S)、兔抗微管相关蛋白轻链 3(LC3)抗体(批号 3868S)、兔抗 p62 抗体(批号 8025S)均购自 Cell Signaling Technology 公司。实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司;多功能酶标仪购自美国 Biotek 公司;显微镜购自日本 Olympus 公司。

2 方法

2.1 动物模型构建及分组

将 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组、川芎嗪组、川芎嗪+EX527 组,每组 10 只。模型组小鼠 ip 10 μ g/kg LPS 和 600 mg/kg *D*-GalN 诱导急

性肝衰竭^[11]。川芎嗪组在造模前 ig 川芎嗪 200 mg/kg^[12]，川芎嗪+EX527 组在 ig 川芎嗪的同时 ip EX527 5 mg/kg^[13]。对照组小鼠给予等量生理盐水。

2.2 生化指标检测

在 LPS 联合 D-GalN 处理小鼠 6 h 后，麻醉小鼠，经眼眶后静脉丛采集血液。处死小鼠，解剖分离肝脏组织。将收集的血液离心 10 min，收集血清，根据说明书使用 AST 和 ALT 试剂盒检测血清中 ALT 和 AST 水平。将收集的肝组织匀浆，收集上清液，根据相应的试剂盒说明书分别检测肝组织中 GSH、MDA、SOD 含量。

2.3 肝组织病理

采用苏木精-伊红染色法对肝组织病理变化进行观察，使用颈椎脱臼法处死小鼠，解剖腹腔，取出肝脏组织，将组织置于 4% 多聚甲醛中过夜，随后用梯度酒精脱水，二甲苯透明，制作 4 μm 肝组织石蜡切片。使用 HE 染色试剂盒，根据说明书对肝组织进行染色，中性树胶封片，最后使用显微镜观察肝组织病理变化。

2.4 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测相关基因表达

根据试剂说明书，使用 Trizol 从肝脏组织中提取总 RNA。使用紫外分光光度计检测 RNA 在 260 nm 和 280 nm 的吸光度值 (A_{260}/A_{280}) 验证 RNA 纯度。使用反转录试剂盒将 RNA 用于合成 cDNA 的第一条链。以 cDNA 为模板，使用 SYBR Green 进行 PCR 反应。 β -actin 作为内部对照，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相关基因的相对表达量。基因引物序列如下。IL-6: 正向 (5'-3') TCCATCCAGTTGCCTTCTTG, 反向 (5'-3') TTCCACGATTTCCAGAGAAC; IL-1 β : 正向 (5'-3') TCGCTCAGGGTCACAAGAAA, 反向 (5'-3') CATCAGAGGCAAGGAGGAAAAC; TNF- α : 正向 (5'-3') AGGCTGCCCGACTACGT, 反向 (5'-3') GACTTTCTCCTGGTATGAGATAGCAA; COX-2: 正向 (5'-3') TGAGCAACTATTCCA AACCAGC, 反向 (5'-3') GCACGTAGTCTTCGATCACTATC; β -actin: 正向 (5'-3') GGCTGTATTCCCCTCCATCG, 反向 (5'-3') CCAGTTGGTAACAATGCCATGT。

2.5 Western blotting 法检测相关蛋白表达量

使用含蛋白酶抑制剂 PMSF 的 RIPA 缓冲液裂解肝组织。根据试剂盒说明书，用 BCA 法测定蛋白质浓度。用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-

PAGE) 电泳分离蛋白质，将分离的蛋白质转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上。使用 QuickBlock™ 封闭液封闭膜 1 h，然后与一抗在 4 °C 下孵育过夜，然后用相应的辣根过氧化物酶偶联的二抗孵育膜 2 h。使用化学发光成像系统对蛋白质进行可视化。Image J 软件分析蛋白质条带的灰度值。

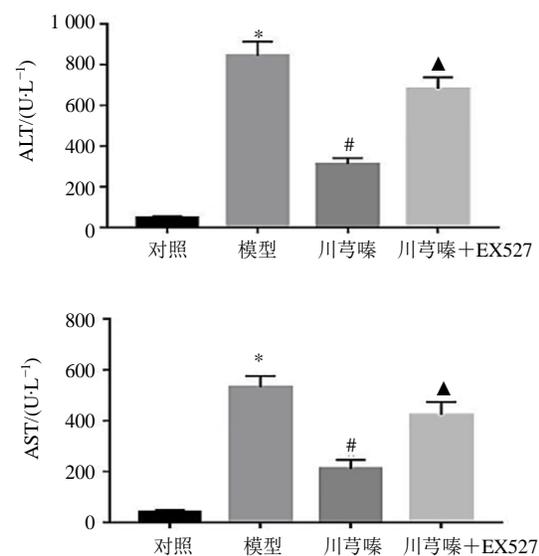
2.6 统计学分析

使用 SPSS 21.0 和 GraphPad Prism 7.0 软件对数据进行统计学分析，所有数据均表示为 $\bar{x} \pm s$ 。各组间差异采用单因素方差 (ANOVA) 分析。

3 结果

3.1 川芎嗪对急性肝衰竭小鼠血清 ALT 和 AST 水平的影响

与对照组比较，模型组血清 ALT 和 AST 水平均显著升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，川芎嗪组血清 ALT 和 AST 水平均显著降低 ($P < 0.05$)；与川芎嗪组比较，川芎嗪+EX527 组血清 ALT 和 AST 水平均显著升高 ($P < 0.05$)，见图 1。



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与川芎嗪组比较: ▲ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ vs ligustrazine group

图 1 川芎嗪对急性肝衰竭小鼠血清 ALT 和 AST 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 1 Effects of ligustrazine on serum ALT and AST levels in acute liver failure mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.2 川芎嗪对急性肝衰竭小鼠肝组织病理学改变的影响

对照组小鼠肝组织内肝细胞排列整齐，没有炎症和细胞坏死。模型组小鼠肝组织出现明显的病理改变，肝细胞肿胀，排列紊乱，细胞坏死以及炎症

细胞浸润。与模型组比较,川芎嗪处理后小鼠肝细胞坏死区域以及炎症细胞浸润明显减少;与川芎嗪组比较,川芎嗪+EX527 组小鼠肝细胞坏死区域显著增加,炎症细胞浸润增多,见图 2。

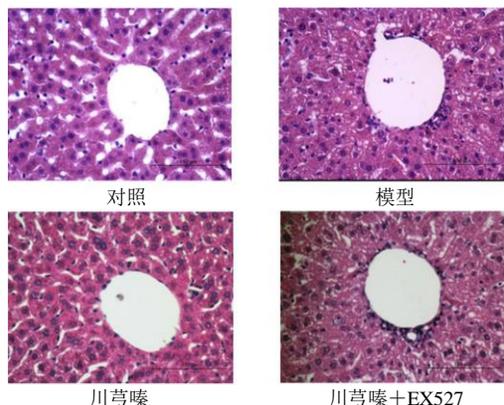


图 2 川芎嗪对急性肝衰竭小鼠肝组织病理学改变的影响 (HE 染色, ×400)

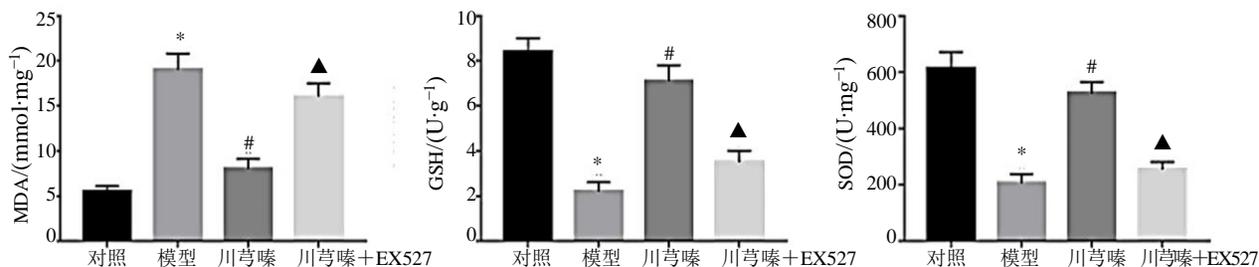
Fig. 2 Effect of ligustrazine on pathological changes of liver tissue in acute liver failure mice (HE staining, ×400)

3.3 川芎嗪对急性肝衰竭小鼠肝组织中氧化应激水平的影响

与对照组比较,模型组小鼠肝组织中 MDA 水平显著升高,SOD 和 GSH 水平显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,川芎嗪组小鼠肝组织中 MDA 水平显著降低,SOD 和 GSH 水平显著升高 ($P < 0.05$);与川芎嗪组比较,川芎嗪+EX527 组小鼠肝组织中 MDA 水平显著升高,SOD 和 GSH 水平显著降低 ($P < 0.05$),见图 3。

3.4 川芎嗪对急性肝衰竭小鼠肝组织中炎症细胞因子 mRNA 水平的影响

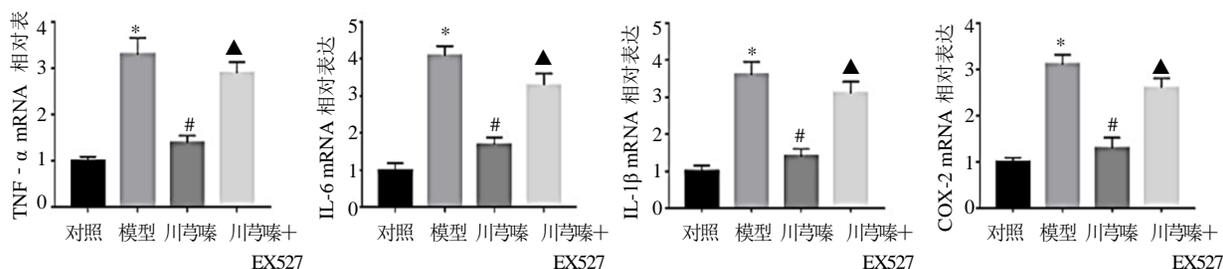
与对照组比较,模型组小鼠肝组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、COX-2 mRNA 水平均显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,川芎嗪组小鼠肝组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 COX-2 mRNA 水平均显著降低 ($P < 0.05$);与川芎嗪组比较,川芎嗪+EX527 组小鼠肝组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 COX-2 mRNA 水平均显著升高 ($P < 0.05$),见图 4。



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与川芎嗪组比较: ▲ $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ vs ligustrazine group

图 3 川芎嗪对急性肝衰竭小鼠肝组织中氧化应激水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Effect of ligustrazine on the level of oxidative stress in liver tissues of acute liver failure mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)



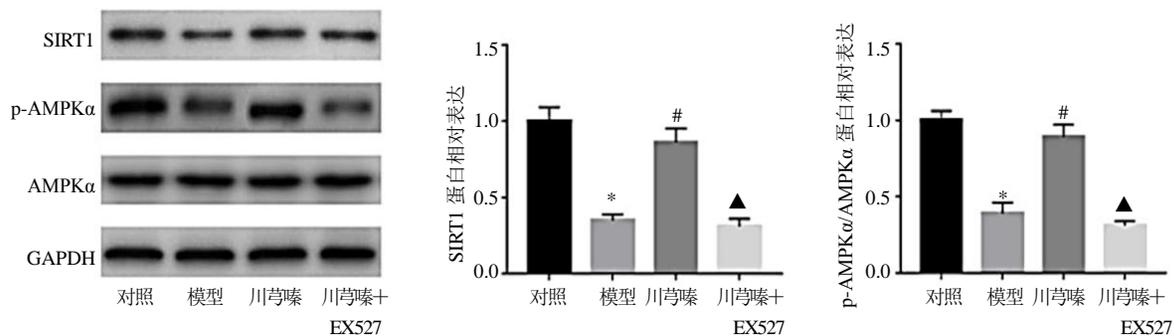
与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与川芎嗪组比较: ▲ $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ vs ligustrazine group

图 4 川芎嗪对急性肝衰竭小鼠肝组织中炎症细胞因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 4 Effect of ligustrazine on level of inflammatory cytokines in liver tissue of acute liver failure mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.5 川芎嗪对急性肝衰竭小鼠肝组织中 AMPK/SIRT1 通路蛋白的影响

与对照组比较, 模型组肝组织中 SIRT1 和 p-AMPK α /AMPK α 蛋白水平均显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 川芎嗪组小鼠肝组织中 SIRT1 和 p-AMPK α /AMPK α 蛋白水平均显著升高 ($P < 0.05$); 与川芎嗪组比较, 川芎嗪+EX527 组小鼠肝组织中 SIRT1 和 p-AMPK α /AMPK α 蛋白水平均降低 ($P < 0.05$), 见图 5。

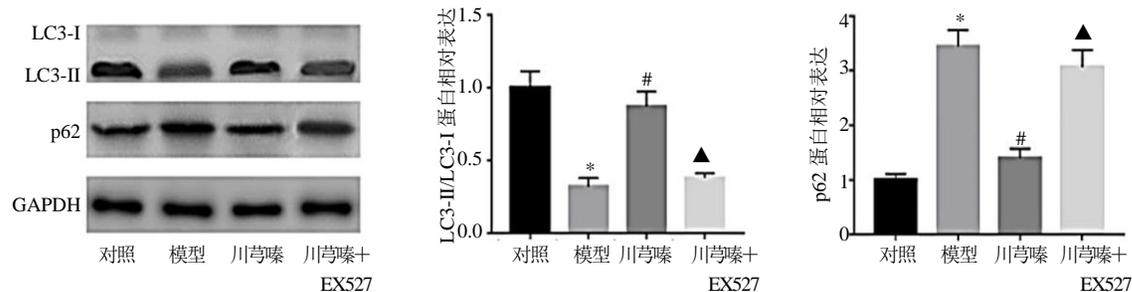


与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与川芎嗪组比较: ▲ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ vs ligustrazine group

图 5 川芎嗪对急性肝衰竭小鼠肝组织中 AMPK/SIRT1 通路蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 5 Effect of ligustrazine on AMPK/SIRT1 pathway protein in liver tissue of acute liver failure mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与川芎嗪组比较: ▲ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ vs ligustrazine group

图 6 川芎嗪对急性肝衰竭小鼠肝组织中自噬蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 6 Effect of ligustrazine on autophagy protein in liver tissue of acute liver failure mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

4 讨论

肝脏是重要的代谢组织, 在维持平衡和健康方面起着重要作用。急性肝衰竭是一种严重危及生命的临床综合征, 其特点是发展迅速, 死亡率高。寻找一种有效治疗急性肝衰竭的临床方法是一项重要的挑战。近年来, 越来越多的证据表明川芎中提取的川芎嗪具有明显的抗炎和抗氧化应激作用。如川芎嗪通过 SIRT1/NF- κ B 和 Nrf-2/血红素氧合酶 1 (HO-1) 通路减轻关节炎模型大鼠的炎症和氧化

3.6 川芎嗪对急性肝衰竭小鼠肝组织中自噬蛋白的影响

与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中 LC3-II/LC3-I 蛋白表达降低, 而 p62 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 川芎嗪组小鼠肝组织中 LC3-II/LC3-I 蛋白表达显著升高, p62 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$); 与川芎嗪组比较, 川芎嗪+EX527 组小鼠肝组织中 LC3-II/LC3-I 蛋白表达显著降低, 而 p62 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$), 见图 6。

应激^[14]。此外, 川芎嗪可以减少非酒精性脂肪肝高脂饮食小鼠肝脏的炎症反应^[15]。因此, 基于川芎嗪的药理作用, 本研究通过 ip LPS/D-GalN 成功建立急性肝衰竭模型, 首次报道了川芎嗪对急性肝衰竭的潜在治疗效果, 并初步探讨了川芎嗪的作用机制。AST 和 ALT 的活性可作为急性肝损伤的关键生化标志物^[16]。在本研究中, LPS/D-GalN 诱导的急性肝衰竭小鼠肝组织形态和结构损伤, 肝细胞死亡, 生化标志物 ALT、AST 水平明显增加, 而川芎

嗙治疗改善了肝组织损伤以及 ALT、AST 水平。

炎症和氧化应激是导致肝损伤、肝纤维化、坏死和凋亡的重要因素^[17-18]。TNF- α 是与 LPS/D-GalN 诱导的肝损伤相关的重要炎症介质，可诱导肝细胞坏死，进而导致器官衰竭。此外，TNF- α 可能引发炎症级联反应并诱导其他细胞因子的产生，包括 IL-10 和 IL-6。有研究报道，抑制 TNF- α 合成可抑制细胞因子的产生并减少肝损伤^[19]。有研究报道 COX-2 作为关键的炎症介质参与了肝损伤的发生发展^[20]。在本研究中，LPS/D-GalN 诱导的急性肝衰竭小鼠肝组织中炎症因子 TNF- α 、IL-10、IL-6、COX-2 和 MDA 水平增加，GSH 和 SOD 水平降低，而川芎嗙治疗显著减少炎症因子的产生，并降低了氧化应激水平，表明川芎嗙治疗改善了急性肝衰竭小鼠的炎症反应和氧化损伤，提示川芎嗙对肝脏具有保护作用。

基于上述结果，本研究进一步探讨了川芎嗙对急性肝衰竭小鼠中 LPS/D-GalN 诱导的炎症的保护机制。SIRT1 是 Sir2 家族的重要成员，通过调节自噬在预防肝脏代谢损伤中发挥关键作用^[21]。SIRT1 是由多靶点相互作用调节，其中 AMPK 激酶起重要作用。在应激条件时，磷酸化的 AMPK 上调了 SIRT1 的表达，触发自噬以调节能量稳态和代谢应激^[22]。前期研究表明，肝细胞 AMPK α 是肝脏代谢和先天免疫功能的关键调节因子^[23]。在本研究中，LPS/D-GalN 诱导的急性肝衰竭小鼠肝组织中 SIRT1 和 p-AMPK α /AMPK α 蛋白水平均降低，而川芎嗙处理后 SIRT1 和 p-AMPK α /AMPK α 的水平升高。进一步证实了 AMPK/SIRT1 水平的上调与炎症因子的表达趋势相反。将 SIRT1 抑制剂 EX527 和川芎嗙联合处理 LPS/D-GalN 诱导的急性肝衰竭小鼠后，发现 EX527 显著逆转了川芎嗙对急性肝衰竭小鼠的肝脏保护作用，表明川芎嗙可能通过调控 AMPK/SIRT1 信号通路抑制 LPS/D-GalN 诱导的急性肝衰竭小鼠肝脏炎症反应。

在肝脏中，自噬对于维持细胞功能中能量和营养平衡，清除受损蛋白质和抵抗氧化应激至关重要。因此，肝脏自噬的紊乱可能对肝脏的生理和病理疾病有重要影响。最近的一些报道表明自噬与急性肝衰竭发生发展中的炎症反应密切相关^[24]。本研究结果发现，川芎嗙治疗后小鼠肝组织中自噬蛋白 LC3II/LC3I 的水平明显高于 LPS/D-GalN 诱导的小鼠中的水平，而 p62 水平较低，而 EX527 则逆转了

这一结果。表明川芎嗙诱导自噬激活，而 SIRT1 抑制剂 EX527 可能通过抑制自噬来逆转川芎嗙对肝脏的保护作用。因此，川芎嗙诱导自噬可能是预防和治疗肝损伤的一种新颖而有前途的方法。

综上所述，本研究表明川芎嗙预处理可能通过调节 AMPK/SIRT1 通路和自噬来减轻 LPS/D-GalN 诱导的急性肝衰竭炎症反应，改善肝脏损伤。为川芎嗙临床治疗急性肝衰竭提供理论和实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Patel P, Okoronkwo N, Pysopoulos N T. Future approaches and therapeutic modalities for acute liver failure [J]. *Clin Liver Dis*, 2018, 22(2): 419-427.
- [2] 张天翼, 于也萍, 夏强, 等. 肝移植治疗慢加急性肝衰竭研究进展 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2021, 41(2): 257-261.
- [3] Gong X, Yang Y, Huang L, et al. Antioxidation, anti-inflammation and anti-apoptosis by paeonol in LPS/d-GalN-induced acute liver failure in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 46: 124-132.
- [4] Huang S, Mo C, Zeng T, et al. Lupeol ameliorates LPS/D-GalN induced acute hepatic damage by suppressing inflammation and oxidative stress through TGF β 1-Nrf2 signal pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(5): 6592-6605.
- [5] 刘瑞雪, 鲁桓兵, 宋育林. AMPK 磷酸化在异烟肼致肝损伤中的作用 [J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(8): 1240-1244.
- [6] Morigi M, Perico L, Benigni A. Sirtuins in renal health and disease [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2018, 29(7): 1799-1809.
- [7] Ge Y, Huang M, Yao Y M. Autophagy and proinflammatory cytokines: Interactions and clinical implications [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018, 43: 38-46.
- [8] Hazari Y, Bravo-San Pedro J M, Hetz C, et al. Autophagy in hepatic adaptation to stress [J]. *J Hepatol*, 2020, 72(1): 183-196.
- [9] Sydor S, Manka P, Best J, et al. Krüppel-like factor 6 is a transcriptional activator of autophagy in acute liver injury [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8119.
- [10] Lu C, Xu W, Shao J, et al. Nrf2 activation is required for ligustrazine to inhibit hepatic steatosis in alcohol-preferring mice and hepatocytes [J]. *Toxicol Sci*, 2017, 155(2): 432-443.
- [11] Lei Y C, Lu C L, Chen L, et al. C5a/C5aR pathway is essential for up-regulating SphK1 expression through p38-MAPK activation in acute liver failure [J]. *World J*

- Gastroenterol*, 2016, 22(46): 10148-10157.
- [12] 陈哲, 刘竟芳, 朱洪怡, 等. 川芎嗪对土三七诱导的小鼠肝小静脉闭塞病治疗机制的研究 [J]. 胃肠病学, 2016, 21(1): 21-25.
- [13] 王龙海. 百里酞通过激活 SIRT1/STAT3 通路对脓毒症所致大鼠肝损伤和糖代谢紊乱的保护作用 [J]. 重庆医科大学学报, 2021, 46(12): 1473-1478.
- [14] Li Y, Zhu Z, Zhang T, *et al*. Ligustrazine attenuates inflammation and oxidative stress in a rat model of arthritis via the Sirt1/NF- κ B and Nrf-2/HO-1 pathways [J]. *Arch Pharm Res*, 2019, 42(9): 824-831.
- [15] Chen B, Ma Y, Xue X, *et al*. Tetramethylpyrazine reduces inflammation in the livers of mice fed a high fat diet [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(4): 2561-2568.
- [16] 许明贤, 张洁容, 唐瑞娣, 等. 左旋肉碱和茶多酚对脂多糖诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用及机制比较 [J]. 实用医学杂志, 2020, 36(6): 711-715.
- [17] Mohammed S, Nicklas E H, Thadathil N, *et al*. Role of necroptosis in chronic hepatic inflammation and fibrosis in a mouse model of increased oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 164: 315-328.
- [18] Liu Y, Lu T, Zhang C, *et al*. Activation of YAP attenuates hepatic damage and fibrosis in liver ischemia-reperfusion injury [J]. *J Hepatol*, 2019, 71(4): 719-730.
- [19] 窦晓伟, 张卉, 张克明, 等. 白细胞介素-35 在小鼠脓毒症肝损伤早期的保护作用 [J]. 中华实验外科杂志, 2021, 38(10): 1901-1905.
- [20] 潘妍霓, 赵欣, 龙兴瑶, 等. 大叶苦丁茶多酚对四氯化碳致小鼠肝损伤的预防作用 [J]. 食品工业科技, 2019, 40(9): 287-294.
- [21] Cho H I, Seo M J, Lee S M. 2-Methoxyestradiol protects against ischemia/reperfusion injury in alcoholic fatty liver by enhancing sirtuin 1-mediated autophagy [J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 131: 40-51.
- [22] Luo G, Jian Z, Zhu Y, *et al*. Sirt1 promotes autophagy and inhibits apoptosis to protect cardiomyocytes from hypoxic stress [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(5): 2033-2043.
- [23] Kikuchi S, Piraino G, O'Connor M, *et al*. Hepatocyte-specific deletion of AMPK α 1 results in worse outcomes in mice subjected to sepsis in a sex-specific manner [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 210.
- [24] Lin X, Cui M, Xu D, *et al*. Liver-specific deletion of EVala/Tmem166 aggravates acute liver injury by impairing autophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(7): 768.

[责任编辑 高源]