

大黄素甲醚通过 HMGB1-NLRP3 信号通路缓解药物性肝损伤的作用研究

李纪丰, 王瑞婕, 张宇欣, 张庆镐, 白 婷*, 杨 勇*

大连大学 慢性病研究中心大连市重点实验室, 辽宁 大连 116622

摘要: 目的 探讨大黄素甲醚 (physcion, PHY) 对对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 诱导小鼠药物性肝损伤的保护作用及其机制。方法 C57BL/6 小鼠采用随机数字表法分为 5 组, 分别为对照组, 模型组, 阳性对照组, 大黄素甲醚低、高剂量 (20、40 mg/kg) 组, 采用 ip APAP (300 mg/kg) 建立药物性肝损伤小鼠模型, 观察大黄素甲醚对小鼠肝脏形态及病理学的影响, 检测小鼠血清中天冬氨酸转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 及肝组织谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 水平; 采用 Western blotting 及反转录酶-聚合酶链锁反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测小鼠肝组织高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein B1, HMGB1)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族 pyrin 结构域蛋白 3 (nucleotide binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain protein 3, NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-1 (cysteinyl aspartate specific proteinase-1, Caspase-1) 蛋白及 mRNA 水平, 同时检测白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , *IL-1 β*) 及 *IL-18* mRNA 表达水平。结果 与模型组相比, 大黄素甲醚低、高剂量组小鼠血清 AST、ALT 水平及肝组织 MDA 水平, HMGB1、NLRP3、Caspase-1 蛋白和 mRNA 表达量, *IL-1 β* 、*IL-18* mRNA 表达量显著降低 ($P < 0.01$), 肝组织 GSH 活性显著升高 ($P < 0.01$)。病理学染色结果显示, 与模型组相比, 大黄素甲醚可明显改善小鼠肝组织坏死、细胞炎性浸润, 且呈剂量相关性。结论 大黄素甲醚对 APAP 诱导的药物性肝损伤有一定的保护作用, 其机制可能与其抗氧化应激、减少炎性反应, 抑制 HMGB1-NLRP3 炎性小体信号通路有关。

关键词: 大黄素甲醚; 药物性肝损伤; 对乙酰氨基酚; 高迁移率族蛋白 B1; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族 pyrin 结构域蛋白 3; 白细胞介素-1 β

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)07-2095-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.07.019

Effect of physcion on alleviating drug-induced liver injury through HMGB1-NLRP3 signaling pathway

LI Ji-feng, WANG Rui-jie, ZHANG Yu-xin, ZHANG Qing-gao, BAI Ting, YANG Yong

Dalian Key Laboratory of Chronic Disease Research Center, Dalian University, Dalian 116622, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of physcion (PHY) on drug-induced liver injury in mice induced by acetaminophen (APAP) and its possible mechanism. **Methods** C57BL/6 mice were divided into five groups by random number table method: control group, model group, positive control group, low-dose and high-dose PHY groups (20 and 40 mg/kg). The drug-induced liver injury model was established by intraperitoneal injection of APAP, the effects of PHY on liver morphology and pathology in mice were observed, the levels of aspartate transferase (AST), alanine transferase (ALT) in serum, glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) in liver tissue were detected. The protein and mRNA expression of high mobility group protein B1 (HMGB1), nucleotide binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain protein 3 (NLRP3), cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (Caspase-1) in liver tissue were detected by Western blotting and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR); Then the

收稿日期: 2021-11-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81900532); 国家自然科学基金项目 (81700523); 中央引导地方科技发展资金自由探索类基础研究项目 (负责人杨勇); 辽宁省自然科学基金指导计划项目 (2019-ZD-0570)

作者简介: 李纪丰 (1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向为药物性肝损伤及药物作用机制研究。E-mail: 994701650@qq.com

*通信作者: 杨 勇 (1987—), 男, 朝鲜族, 博士, 硕士生导师, 从事药物性肝损伤作用机制及药物作用机制研究。

Tel: (0411)87403419 E-mail: yangyong@dlu.edu.cn

白 婷 (1985—), 女, 博士, 硕士生导师, 从事酒精性肝病作用机制及药物作用机制研究。E-mail: baiting@dlu.edu.cn

interleukin-1 β (*IL-1 β*) and *IL-18* mRNA levels were detected by RT-PCR. **Results** Compared with model group, the serum AST and ALT levels, liver MDA levels, HMGB1, NLRP3, Caspase-1 protein and mRNA expression levels, *IL-1 β* and *IL-18* mRNA expression levels of mice in low and high doses of PHY groups were significantly decreased ($P < 0.01$), and the liver GSH activity was significantly increased ($P < 0.01$). The HE staining results indicated that PHY could obviously improve the liver necrosis and inflammatory cell infiltration in dose-dependent manner, and were better than those in model group. **Conclusion** PHY has a protective effect on APAP induced drug-induced liver injury, and its mechanism may related to anti-oxidant response effect, reducing inflammatory response and inhibiting HMGB1-NLRP3 inflammasomes signal pathway.

Key words: physcion; drug-induced liver injury; acetaminophen; high mobility group protein B1 (HMGB1); nucleotide binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain protein 3 (NLRP3); interleukin-1 β (IL-1 β)

药物性肝损伤 (drug-induced liver injury, DILI) 是指由各类处方或非处方化学药物、传统中药及天然药、保健品、生物制剂、膳食补充剂及其代谢产物乃至辅料等诱发的不同程度的肝损伤^[1-2]。据统计, 目前全球有 1100 多种上市药物具有潜在肝毒性, 常见的包括非甾体类抗炎药、抗感染药物、抗肿瘤药物、中枢神经系统用药、心血管系统用药、代谢性疾病用药、激素类药物、某些生物制剂等^[3]。另外, 作为传统中药的使用大国, 由中药引起的 DILI 也逐渐被重视。

对乙酰氨基酚 (又名扑热息痛, acetaminophen, APAP) 是引起 DILI 的常见原因。APAP 是临床常用的解热镇痛药, 广泛应用于普通感冒或流行性感感冒的辅助治疗。但 APAP 过量的摄入可引起严重的肝损伤, 甚至可能发展为肝功能衰竭而危及生命^[4]。APAP 过量时经细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 氧化酶 (cytochrome 2E1, CYP2E1) 代谢成为 *N*-乙酰-对苯醌亚胺 (*N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine, NAPQI) 的过程中会产生超氧阴离子, 超氧阴离子在多种阴、阳离子及酶的参与下使活性氧 (reactive oxygen species, ROS) /活性氮 (reactive nitrogen species, RNS) 产生增加, 超出抗氧化系统的清除能力, 使机体处于氧化应激状态, 引起 DNA 氧化损伤和蛋白质表达异常, 最终导致肝细胞坏死^[5]。

近年研究发现, 核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族 pyrin 结构域蛋白 3 (nucleotide binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain protein 3, NLRP3) 是 NLR 中衍生的多域蛋白复合物, 是固有免疫的重要组成因子, 能够识别不同病原体的分子模式, 再通过接头分子即具有半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 (cysteinyl aspartate specific proteinase, Caspase) 激活及招募结构域的凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC), 激活效应分子促

进炎症因子成熟, 参与细胞炎症反应^[6-7]。NLRP3 炎性小体的激活是肝脏损伤的关键分子机制, 被认为是 APAP 过量后小鼠肝损伤模型中的潜在介质^[8]。当死亡肝细胞或受损肝细胞释放时, 会激活局部免疫细胞以及启动炎症应答, 这就包括一些分子、受体如高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein B1, HMGB1)、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP)、核 DNA 片段、胆汁酸等所发挥的作用。HMGB1 是一种细胞内结合蛋白, 是已知的危险信号或损伤相关的分子模式^[9], 在炎症中发挥关键作用, 与无菌炎症、免疫和神经退行性疾病有关^[10], 使其成为治疗肝损伤的新兴靶点。

大黄素甲醚 (physcion, PHY) 又名朱砂莲乙素、非斯酮, 是分布最广泛的一种蒽醌类物质, 广泛分布于大黄、虎杖、何首乌和决明子等中药中^[11]。现代药理学研究表明, 大黄素甲醚具有抗炎、抗氧化、抗癌以及抗白血病等多种药理活性^[12]。本课题组前期研究表明, 大黄素甲醚可通过沉默信息调节因子蛋白 1 (silent information regulator factor 2 related enzyme 1, SIRT1)-腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 信号通路改善酒精性脂肪变性损伤和炎症水平, 对肝脏具有一定的保护作用^[13], 但大黄素甲醚对药物性肝损伤的作用还有待进一步研究。因此, 本研究拟从大黄素甲醚减少炎症反应及抑制 HMGB1、NLRP3 炎性小体激活等机制证明大黄素甲醚对 APAP 诱导的 DILI 具有保护作用, 为大黄素甲醚的临床应用提供实验依据和理论基础。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 40 只, 8~10 周龄, 体质量 (20 \pm 2) g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司 [批准号 SCXK (辽) 2020-0001]。实验小鼠安置于大连大学医学院标准化饲养动物房, 相对湿

度 40%~60%，温度 (23±2) °C，12 h 光照/12 h 黑暗周期中自由进食和饮水。动物实验经大连大学附属中山医院伦理委员会批准 (批准号 DWLL2019060)。

1.2 药品与试剂

大黄素甲醚 (批号 HY-N0108)、*N*-乙酰半胱氨酸 (*N*-acetylcysteine, NAC, 批号 HY-B0215) 购买于 MCE 上海皓元生物医药科技有限公司; 谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 试剂盒 (批号 C010-2-1)、谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 试剂盒 (批号 C009-2-1)、还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 试剂盒 (批号 A006-2-1)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 A003-1-2) 均购买于南京建成生物工程研究所; HMGB1 抗体 (批号 6893)、GAPDH 抗体 (批号 2118)、HRP 标记的山羊抗兔二抗 (批号 7074)、HRP 标记的山羊抗小鼠二抗 (批号 7076) 购买于美国 Cell Signaling Technology 公司; NLRP3 抗体 (批号 214185) 购买于英国 Abcam 公司; Caspase-1 抗体 (批号 392736) 购买于美国 Santa Cruz 公司; TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂 (批号 DP424) 购买于天根生化科技有限公司。

1.3 仪器

高速冷冻离心机、Multiskan FC 酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司); 蛋白电泳转膜系统 (美国 Bio Rad 公司); 荧光定量 PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、给药与造模

C57BL/6 小鼠适应性饲养 1 周, 采用随机数字表法分为 5 组, 即对照组、模型组、阳性对照组和大黄素甲醚低、高剂量 (20、40 mg/kg) 组, 每组 8 只。对照组和模型组 ig 等量生理盐水, 阳性对照组 ip 300 mg/kg NAC, 大黄素甲醚低、高剂量组每天 ig 给药 1 次, 连续给药 5 d。给药第 6 天, 小鼠禁食不禁水 12 h, 除对照组外, 其余 4 组 ip APAP (300 mg/kg), 6 h 后采用乙醚麻醉小鼠, 眼球采血, 颈椎脱臼处死后取出肝脏左前叶用多聚甲醛固定, 其余置-80 °C 冻存备用。

2.2 血清生化指标及氧化应激指标测定

各组小鼠眼球采血, 收集血浆, 血样在 4 °C, 3000 r/min 离心 30 min, 取上清液得血清。采用检测试剂盒测定血清中 AST、ALT 水平及肝组织中 GSH 活性和 MDA 含量。

2.3 肝组织病理观察

取各组小鼠多聚甲醛中固定的肝组织, 常规石蜡包埋切片 (厚 5 μm), 进行 HE 染色, 200 倍光学显微镜下观察分析肝组织病理改变情况。

2.4 免疫组织化学染色

取各组小鼠肝组织石蜡切片, 脱蜡至水, 抗原修复, 5% BSA 封闭后加入抗体 HMGB1 (1:100)、NLRP3 (1:100), 4 °C 孵育过夜, 次日, 二抗室温孵育 1 h, DAB 显色后加入苏木素流水返蓝, 脱水、透明、封片, 200 倍光学显微镜下观察 HMGB1、NLRP3 表达情况。

2.5 Western blotting 检测 HMGB1、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达水平

取各组小鼠肝组织, 加入组织裂解液匀浆研磨, 冰上充分裂解 30 min 后 4 °C 离心 (1000 r/min, 15 min), 上清即为肝脏总蛋白。采用 BCA 法测定蛋白质质量浓度, 蛋白样品经 10% SDS-PAGE 胶电泳, 湿法转膜; 5% 脱脂奶室温封闭 1 h 后, 分别加入 HMGB1 (1:1000)、NLRP3 (1:1000)、Caspase-1 (1:1000)、GAPDH (1:1000) 抗体, 4 °C 孵育过夜。次日, 加入相应 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1 h 后显影, 采用 Quantity One 软件进行目标条带灰度值分析。

2.6 反转录酶-聚合酶链锁反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测小鼠肝脏 HMGB1、NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 mRNA 表达量

按照试剂盒说明书提取各组小鼠肝组织总 RNA 并合成 cDNA, 进行 RT-PCR 分析。实验所用相关蛋白基因 HMGB1、NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18、GAPDH 序列由上海生工生物工程股份有限公司代为设计并合成引物, 引物序列见表 1。

2.7 统计学分析

采用 GraphPad Prism 6.0 程序进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用单因素方差分析和 Tukey's 多因素 *t* 检验分析组间差异。

3 结果

3.1 大黄素甲醚对小鼠血清中 AST、ALT 水平的影响

如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 AST、ALT 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 大黄素甲醚高、低剂量组能够明显抑制小鼠血清 AST、ALT 水平的升高 ($P < 0.01$), 说明大黄素甲醚具有较好的肝脏损伤保护作用。

表 1 各引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	种属	引物序列 (5'-3')	长度/bp
<i>HMGB1</i>	<i>Mus musculus</i>	F: GCCCATTGTTGGGTCACATGG R: TGCAGGGTGTGTGGACAAAA	82
<i>NLRP3</i>	<i>Mus musculus</i>	F: ATCAACAGGCGAGACCTCTG R: GTCCTCCTGGCATAACCATAGA	96
<i>Caspase-1</i>	<i>Mus musculus</i>	F: ACAAGGCACGGGACCTATG R: TCCCAGTCAGTCCTGGAAATG	237
<i>IL-1β</i>	<i>Mus musculus</i>	F: GTACATCAGCACCTCACAAG R: CACAGGCTCTCTTTGAACAG	268
<i>IL-18</i>	<i>Mus musculus</i>	F: GATCAAAGTGCCAGTGAACC R: AACTCCATCTTGTGTGTCC	233
<i>GAPDH</i>	<i>Mus musculus</i>	F: AGCCAAAAGGGTCATCATCT R: GGGGCCATCCACAGTCTTCT	229

表 2 各组小鼠血清 AST、ALT 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Serum AST, ALT content in mice of each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)
对照	—	12.20 ± 1.55	4.89 ± 4.61
模型	—	29.93 ± 7.35 ^{##}	130.65 ± 8.97 ^{##}
NAC	300	6.77 ± 2.16 ^{**}	56.03 ± 3.75 ^{**}
大黄素甲醚	20	13.40 ± 3.96 ^{**}	113.73 ± 6.97 ^{**}
	40	8.57 ± 4.88 ^{**}	106.93 ± 3.80 ^{**}

与对照组比较: ^{##}*P* < 0.01; 与模型组比较: ^{**}*P* < 0.01, 表 3、图 2~5 同

^{##}*P* < 0.01 vs control group; ^{**}*P* < 0.01 vs model group, same as table 3 and fig. 2—5

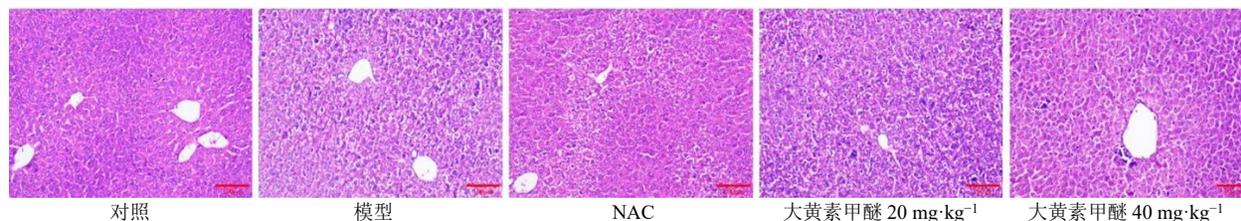


图 1 小鼠肝脏病理组织形态观察 (HE, ×200)

Fig. 1 Pathological changes of mice livers (HE, × 200)

(*P* < 0.01)。与对照组比较, 模型组 MDA 水平显著升高 (*P* < 0.01), 大黄素甲醚低、高剂量组及 NAC 阳性对照组肝组织 MDA 水平明显降低 (*P* < 0.01)。说明大黄素甲醚可通过增强肝组织抗氧化能力以及减缓 APAP 对肝细胞产生的脂质过氧化作用发挥肝保护作用。

3.2 大黄素甲醚对小鼠肝组织病理变化的影响

如图 1 可见, 对照组小鼠肝小叶结构完整, 肝细胞周围中央静脉呈放射状排列, 模型组小鼠肝组织可见大面积坏死, 门管区伴有炎症细胞浸润。大黄素甲醚低、高剂量组及 NAC 阳性对照组细胞坏死程度明显减轻, 肝细胞排列较规律, 说明大黄素甲醚组在一定程度上能够减轻炎症细胞浸润, 缓解肝组织损伤。

3.3 大黄素甲醚对小鼠肝组织中 GSH 活性和 MDA 水平的影响

结果如表 3 所示, 模型组小鼠肝组织中 GSH 活性明显低于对照组 (*P* < 0.01), 大黄素甲醚低、高剂量组及 NAC 阳性对照组 GSH 活性显著升高

3.4 大黄素甲醚对小鼠肝组织中 HMGB1、NLRP3 蛋白表达的影响

如图 2 显示, 模型组小鼠肝脏 HMGB1 细胞染色有大量棕黄色阳性表达, 大黄素甲醚低、高剂量组及 NAC 阳性对照组 HMGB1 阳性表达显著降低 (*P* < 0.01)。如图 3 所示, 与对照组相比, 模型组小

表 3 各组小鼠肝脏中 GSH 活性和 MDA 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 3 Activities of GSH and levels of MDA in liver tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	GSH/ (μmol·g ⁻¹)	MDA/ (μmol·g ⁻¹)
对照	—	7.49 ± 1.62	3.73 ± 0.78
模型	—	2.43 ± 0.46 ^{##}	8.69 ± 2.60 ^{##}
NAC	300	3.52 ± 0.83 ^{**}	4.83 ± 2.86 ^{**}
大黄素甲醚	40	5.50 ± 1.26 ^{**}	5.59 ± 2.25 ^{**}

鼠肝脏中有大量 NLRP3 棕黄色或棕褐色阳性表达, 大黄素甲醚低、高剂量组及 NAC 阳性对照组 NLRP3 的蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。

3.5 大黄素甲醚对小鼠肝组织中 HMGB1-NLRP3 信号通路的影响

上述结果表明, 大黄素甲醚可下调 APAP 诱导肝损伤小鼠中增加的 HMGB1、NLRP3 的蛋白表达水平, 为了进一步揭示大黄素甲醚的肝保护作用机制, 采用 Western blotting 及 RT-PCR 法检测 HMGB1-

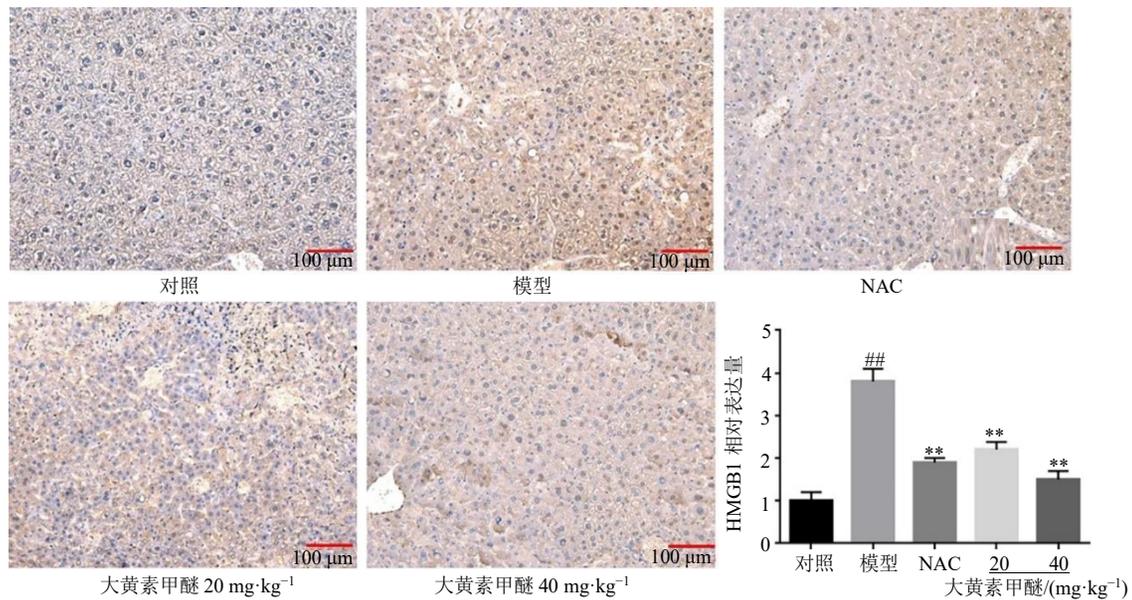


图 2 大黄素甲醚对各组小鼠肝脏 HMGB1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8, \times 200$)

Fig. 2 Effect of physcion on expression of HMGB1 in liver tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8, \times 200$)

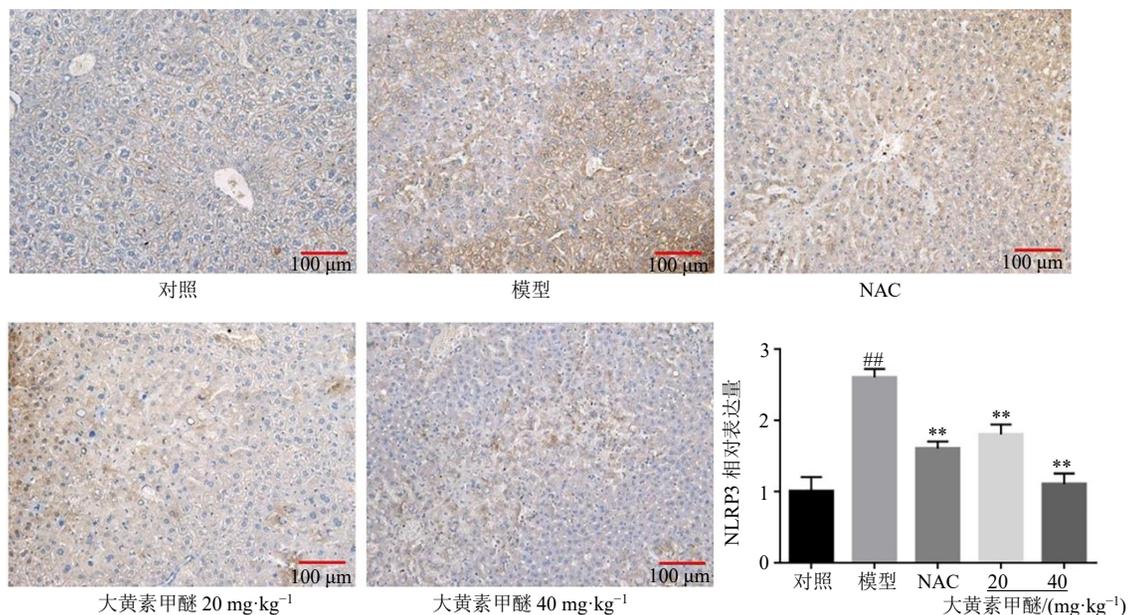


图 3 大黄素甲醚对各组小鼠肝脏 NLRP3 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8, \times 200$)

Fig. 3 Effect of physcion on expression of NLRP3 in liver tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8, \times 200$)

NLRP3 信号通路的相关蛋白及 mRNA 表达水平, 见图 4。结果显示, 与对照组相比, 模型组小鼠肝脏组织中 HMGB1、NLRP3、Caspase-1 的蛋白及 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 大黄素甲醚低、高剂量组及 NAC 阳性对照组 HMGB1、NLRP3、Caspase-1 蛋白及 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。

3.6 大黄素甲醚对小鼠肝脏 *IL-1 β* 、*IL-18* mRNA 表达的影响

炎症的发生是 APAP 导致急性肝损伤的重要机制, 其中以促炎细胞因子 *IL-1 β* 、*IL-18* 的急速升高为主要特征。如图 5 所示, 与对照组相比, 模型组

小鼠肝组织 *IL-1 β* 、*IL-18* mRNA 表达水平明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 大黄素甲醚低、高剂量组及 NAC 阳性对照组 *IL-1 β* 、*IL-18* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。

4 讨论

APAP 是研究药物性肝损伤最常见的药物, 也是建立经典的药物性肝损伤动物模型的常用药物^[14]。APAP 引起的肝脏损伤对人类危害已久, 但目前唯一用于治疗过量 APAP 引起肝脏损伤的上市药物只有 NAC^[15]。本研究结果表明, ip 300 mg/kg APAP 后, 小鼠血清 AST 和 ALT 水平显著升高, 提示 APAP 诱导小鼠肝损伤模型建立成功。预给药大黄素甲醚

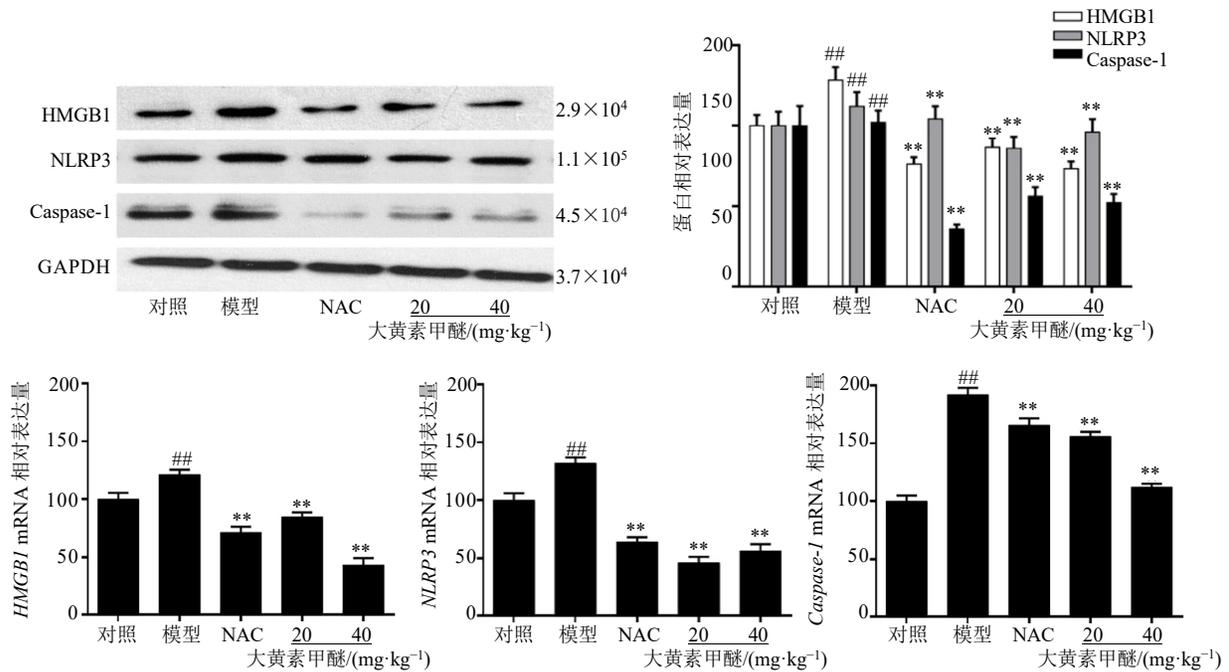


图 4 大黄素甲醚对各组小鼠肝脏 HMGB1、NLRP3、Caspase-1 蛋白及 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 4 Effect of physcion on protein and mRNA expression of HMGB1, NLRP3 and Caspase-1 in liver tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

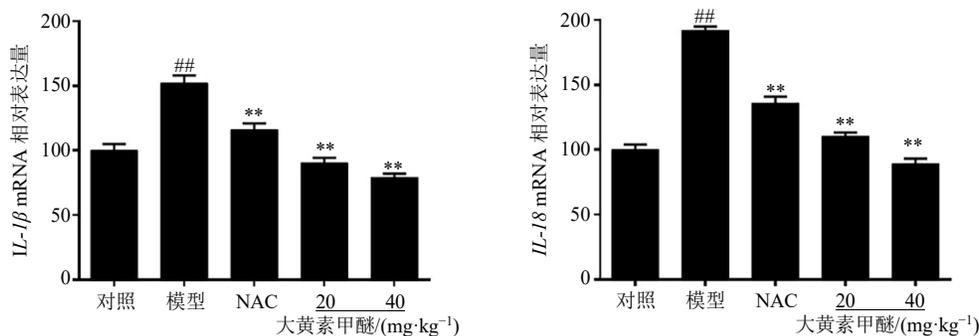


图 5 大黄素甲醚对各组小鼠肝脏 *IL-1 β* 及 *IL-18* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 Effect of physcion on mRNA expression of *IL-1 β* and *IL-18* in liver tissues of mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

及 NAC 明显降低了血清中这些转氨酶的活性,表明大黄素甲醚能够缓解 APAP 诱导的肝损伤。APAP 引起的氧化应激主要与线粒体来源的 ROS 和自由基大量释放有关,ROS 的产生超过了细胞自身所能清除的能力而引起了应激损伤。ROS 作为细胞内第 2 信使参与了 NLRP3 的活化,是调节炎性小体 NLRP3 活化的重要上游信号^[16]。研究表明,清除线粒体来源 ROS 后,NLRP3、Caspase-1 蛋白及基因表达明显下调,从而发挥抗氧化、抗炎作用^[17]。而 GSH 在体内的水平能够体现出机体抗氧化应激的能力,在机体抗氧化应激方面发挥着重要的作用。MDA 是脂质过氧化的重要指标,过量的 APAP 会消耗 GSH,引起胞内脂质过氧化,MDA 水平上升。与模型组相比,大黄素甲醚各剂量组小鼠 GSH 活性上升,MDA 水平明显下降,说明大黄素甲醚可以增强 APAP 诱导的小鼠肝损伤对氧化应激的抵抗力,具有潜在的抗氧化能力。

在 APAP 诱导的肝损伤中, HMGB1 可能是炎症细胞的重要激活剂。当摄入过量 APAP 时被肝细胞色素 CYP2E1 转化成其反应性有毒代谢产物,这些有毒的代谢产物可共价结合 HMGB1,在 APAP 引起的肝损伤过程中,坏死性和凋亡性肝细胞释放出许多内源性细胞外损伤相关分子模式分子 (damage-associated molecular pattern, DAMP),参与各种自身免疫性疾病以及炎症疾病的发病机制^[18]。NLRP3 是存在于细胞浆内感受组织损伤及危险信号的模式识别受体,与接头蛋白 ASC 和 Caspase-1 组成多蛋白复合体 (NLRP3 炎性小体),参与固有免疫应答^[19]。研究表明, HMGB1 作为一种重要的炎性物质与 Caspase-1 的下游物质共同参与 NLRP3 炎性小体通路的致病过程^[20]。NLRP3 炎性小体的过度激活,将 Caspase-1 活化, Caspase-1 前蛋白 IL-1 β 和 IL-18 剪切为成熟的 IL-1 β 和 IL-18,进而激活下游的促炎信号转导通路,引起多种炎症病变^[21]。此外,研究显示在摄入过量 APAP 的小鼠中用 HMGB1 特异性拮抗剂治疗非常成功,并且与标准疗法相比提供了更长的治疗时间窗^[22],越来越多的天然产物已被证明可通过调节 NLRP3 炎性小体通路对 APAP 等诱导的多种化学性肝损伤表现出有益的调控作用^[23]。这些结果与本研究所得结果一致,本研究结果表明大黄素甲醚显著降低 HMGB1 表达,呈剂量相关性,且高剂量组优于阳性对照组。为进一步探索大黄素甲醚抑制炎症反应的可能机制,本研

究检测了大黄素甲醚对 NLRP3 炎性小体相关蛋白的表达,结果证实大黄素甲醚能够抑制 APAP 诱导的肝损伤组织中 NLRP3、Caspase-1 的表达,且高剂量组 IL-1 β 及 IL-18 的 mRNA 水平优于阳性对照组,说明大黄素甲醚能够通过抑制 HMGB1-NLRP3 炎性小体信号通路发挥抗炎效果。此外, HE 染色结果显示,模型组小鼠肝细胞坏死、发生炎性浸润,大黄素甲醚各剂量组及阳性对照组小鼠肝细胞坏死程度减轻,炎性细胞浸润减轻,说明大黄素甲醚能够抑制炎症反应。总之,本研究结果提示大黄素甲醚可能通过抑制 HMGB1-NLRP3 炎性小体信号通路,抗氧化应激及减轻炎症反应,在缓解药物性肝损伤中发挥重要作用,但是更深入的机制需采用 HMGB1 及 NLRP3 基因敲除鼠及细胞实验的进一步研究来揭示。

综上所述,大黄素甲醚能够缓解 APAP 所引起的肝脏炎性损伤,对肝脏具有保护作用,其机制可能与 HMGB1-NLRP3 炎性小体信号通路相关,确切机制有待深入探索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 于乐成,茅益民,陈成伟. 药物性肝损伤诊治指南 [J]. 实用肝脏病杂志, 2017, 20(2): 257-274.
- [2] 朱英,江振洲,张陆勇. 药物性肝损伤的肝细胞死亡方式及治疗药物研究进展 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(5): 1097-1104.
- [3] 李变利,徐丽红. 药物性肝损伤、药物诱导性自身免疫性肝炎和自身免疫性肝炎鉴别诊断研究进展 [J]. 实用肝脏病杂志, 2021, 24(4): 460-463.
- [4] 乞振兰,王梓,李伟,等. 人参果花青素对乙酰氨基酚致小鼠肝损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2017, 48(13): 2704-2710.
- [5] Woolbright B L, Jaeschke H. The impact of sterile inflammation in acute liver injury [J]. *J Clin Transl Res*, 2017, 3(Suppl 1): 170-188.
- [6] Guo Q L, Wu Y, Hou Y Y, et al. Cytokine secretion and pyroptosis of thyroid follicular cells mediated by enhanced NLRP3, NLRP1, NLRC4, and AIM2 inflammasomes are associated with autoimmune thyroiditis [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1197.
- [7] Saghahazrati S, Ayatollahi S A, Kobarfard F, et al. Attenuation of inflammation in streptozotocin-induced diabetic rabbits by *Matricaria chamomilla* oil: A focus on targeting NF- κ B and NLRP3 signaling pathways [J]. 2020, 12(1): 73-78.

- [8] Szabo G, Csak T. Inflammasomes in liver diseases [J]. *J Hepatol*, 2012, 57(3): 642-654.
- [9] Andersson U, Tracey K J. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection [J]. *Annu Rev Immunol*, 2011, 29: 139-162.
- [10] 曾九僧, 纪雅菲, 方洋, 等. NLRP3 炎症小体在抑郁中的作用及药干预研究进展炎症小体在抑郁中的作用及药干预研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(11): 3418-3428.
- [11] Locatelli M, Epifano F, Genovese S, *et al.* Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial properties of bark extracts of *Rhamnus catharticus* and *R. orbiculatus* [J]. *Nat Prod Commun*, 2011, 6(9): 1934578X1100600.
- [12] Pan X P, Wang C, Zhang T. Phycion synergistically enhances the cytotoxicity of sorafenib in hepatocellular carcinoma [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2019, 302(12): 2171-2177.
- [13] 王瑞婕, 杨勇, 白婷. 大黄素甲醚对酒精性肝损伤中 SIRT1-AMPK 通路的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(11): 1557-1562.
- [14] Rivera P, Pastor A, Arrabal S, *et al.* Acetaminophen-induced liver injury alters the acyl ethanolamine-based anti-inflammatory signaling system in liver [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 705.
- [15] 据立萍, 席建军, 赵艳梅, 等. 新型含二硫键和硫酯键的乙酰半胱氨酸衍生物的合成与抗肝损伤活性评价 [J]. *中国现代应用药理学*, 2018, 35(3): 340-344.
- [16] Cai S M, Yang R Q, Li Y, *et al.* Angiotensin-(1-7) improves liver fibrosis by regulating the NLRP3 inflammasome via redox balance modulation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 24(14): 795-812.
- [17] 周蒙恩, 张娜, 阙任焯, 等. 柴胡皂苷-d 对 H₂O₂ 诱导的 HL-7702 细胞 ROS 产生及 NLRP3 炎症体的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(20): 2470-2474.
- [18] Andersson U, Yang H, Harris H. Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2018, 22(3): 263-277.
- [19] Zhong Y F, Kinio A, Saleh M. Functions of NOD-like receptors in human diseases [J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 333.
- [20] Kim E J, Park S Y, Baek S E, *et al.* HMGB1 increases IL-1 β production in vascular smooth muscle cells via NLRP3 inflammasome [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 313.
- [21] Maruyama K, Sakisaka Y, Suto M, *et al.* Cyclic stretch negatively regulates IL-1 β secretion through the inhibition of NLRP3 inflammasome activation by attenuating the AMP kinase pathway [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 802.
- [22] Lundbäck P, Lea J D, Sowinska A, *et al.* A novel high mobility group box 1 neutralizing chimeric antibody attenuates drug-induced liver injury and postinjury inflammation in mice [J]. *Hepatology*, 2016, 64(5): 1699-1710.
- [23] Jian Z, Wang S P, Wang Y T, *et al.* Regulation of the NLRP3 inflammasome with natural products against chemical-induced liver injury [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 164: 105388.

[责任编辑 潘明佳]