

• 药理与临床 •

基于 JNK 信号通路和线粒体氧化应激研究儿茶素拮抗对乙酰氨基酚诱导肝损伤的作用机制

孙武燕, 张娟[#], 张炫, 王春宝, 彭秋玲, 白庆云*

宜春学院化学与生物工程学院, 江西 宜春 336000

摘要: 目的 基于 c-jun *N* 末端激酶 (c-Jun *N*-terminal kinase, JNK) 信号通路探讨儿茶素对对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 诱导肝损伤的作用及机制。方法 ICR 小鼠随机分为对照组、模型组以及儿茶素 (50、100 mg/kg) 组, 小鼠连续 3 d 给儿茶素, 末次给予儿茶素 1 h 后 ip APAP (400 mg/kg), 6 h 后采用苏木素-伊红 (HE) 染色评估小鼠肝脏组织病变, 检测血清中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活性及肝脏中谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性; 考察儿茶素对细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 代谢活性的影响。人正常肝细胞 L02 给予 40、80 $\mu\text{mol/L}$ 儿茶素, 15 min 后给予 15 mmol/L APAP 孵育 6 h, 检测活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平、线粒体膜电位变化、线粒体呼吸链复合物 I 活性、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 含量、胞质 B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白 (B-cell lymphoma-2 associated X protein, Bax)、第 2 个线粒体衍生的半胱氨酸蛋白酶激活剂 (second mitochondria-derived activator of caspases, Smac)、凋亡诱导因子 (apoptosis inducing factor, AIF) 蛋白表达以及线粒体动力相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, Drp1)、线粒体融合蛋白 2 (mitofusin 2, Mfn2)、Bax 蛋白表达和 p-JNK、JNK 蛋白表达。给予 JNK 激活剂后, 考察儿茶素对 APAP 诱导的肝细胞损伤作用。结果 儿茶素显著降低 APAP 诱导的肝损伤小鼠血清中 ALT、AST 活性 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著升高肝脏 GSH 水平和 SOD 活性 ($P < 0.05$ 、 0.01), 改善肝脏损伤。儿茶素显著升高 APAP 处理的 L02 细胞存活率、线粒体膜电位、呼吸链复合物 I 活性和 ATP 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著降低 ROS 水平 ($P < 0.05$), 显著下调线粒体中 Drp1、Bax 和胞质中 Smac、AIF 蛋白表达 ($P < 0.05$), 显著上调线粒体中 Mfn2 和胞质 Bax 的蛋白表达 ($P < 0.05$), 并抑制 JNK 的磷酸化水平 ($P < 0.05$)。给予 JNK 激活剂后, 儿茶素的抗氧化作用和对肝脏的保护作用明显减弱 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 儿茶素通过抑制 JNK 信号通路减轻线粒体氧化应激, 进而拮抗 APAP 诱导的肝损伤。

关键词: 儿茶素; 对乙酰氨基酚; 肝损伤; 线粒体氧化应激; JNK 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)08-2589-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.08.010

Mechanism of catechin on antagonizing acetaminophen-induced liver injury based on JNK signaling pathway and mitochondrial oxidative stress

SUN Wuyan, ZHANG Juan, ZHANG Xuan, WANG Chunbao, PENG Qiuling, BAI Qingyun

School of Chemistry and Bioengineering, Yichun University, Yichun 336000, China

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of catechin on acetaminophen (APAP)-induced liver injury based on c-Jun *N*-terminal kinase (JNK) signaling pathway. **Methods** ICR mice were randomly divided into control, model and catechin (50, 100 mg/kg) groups. The mice were given catechin for three consecutive days through intragastric administration, and after the last dose of catechin for 1 h, mice were ip APAP (400 mg/kg). After 6 h, hematoxylin-eosin (HE) staining was used to evaluate liver tissue lesions in mice. The activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum, as well as the level

收稿日期: 2023-11-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81960748); 江西省教育厅科技项目 (GJJ211640)

作者简介: 孙武燕, 硕士研究生, 研究方向为药物性肝损伤及中药的保肝活性。E-mail: 1060798172@qq.com

#共同第一作者: 张娟, 硕士研究生, 研究方向为药物性肝损伤及中药的保肝活性。E-mail: 2103840739@qq.com

*通信作者: 白庆云, 教授, 研究方向为药物性肝损伤及中药的保肝活性。E-mail: baiqingyun@163.com

of glutathione (GSH) and activity of superoxide dismutase (SOD) in liver were detected. The effect of catechin on activity of cytochrome P450 (CYP450) metabolic enzymes was observed. Normal human liver cells L02 were given 40 and 80 $\mu\text{mol/L}$ catechin, incubated with 15 mmol/L APAP for 6 h after 15 min, reactive oxygen species (ROS) level, changes in mitochondrial membrane potential, mitochondrial respiratory chain complex I activity, adenosine triphosphate (ATP) content, protein expressions of cytoplasmic B-cell lymphoma-2 associated X protein (Bax), second mitochondrial derived activator of caspases (Smac), apoptosis inducing factor (AIF), as well as mitochondrial dynamin-related protein 1 (Drp1), mitofusin 2 (Mfn2), Bax, and p-JNK, JNK were detected. After administering JNK activators, the effect of catechin on APAP-induced liver cell damage was investigated. **Results** Catechin significantly reduced the activities of ALT and AST in serum of APAP-induced liver injury mice ($P < 0.05, 0.01$), significantly increased GSH level and SOD activity in liver ($P < 0.05, 0.01$), and improved liver injury. Catechin significantly increased the survival rate, mitochondrial membrane potential, mitochondrial respiratory chain complex I activity and ATP level of L02 cells treated with APAP ($P < 0.05, 0.01$), significantly reduced ROS level ($P < 0.05$), significantly downregulated the protein expressions of Drp1, Bax in mitochondria and Smac, AIF in cytoplasm ($P < 0.05$), significantly upregulated the protein expressions of Mfn2 in mitochondria and cytoplasmic Bax ($P < 0.05$), and inhibited the phosphorylation level of JNK ($P < 0.05$). After administering JNK activators, the antioxidant and liver protective effects of catechins were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Catechin alleviates mitochondrial oxidative stress by inhibiting JNK signaling pathway, thereby antagonizing APAP induced liver injury.

Key words: catechin; acetaminophen; liver injury; mitochondrial oxidative stress; JNK signaling pathway

药物性肝损伤 (drug-induced liver injury, DILI) 是由多种药物及其代谢产物引起的肝脏疾病^[1]。对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 属于非甾体抗炎药,也是诱发 DILI 最为常见的药物。过量的 APAP 可诱导肝细胞线粒体的氧化/亚硝化应激和细胞内信号传导。过氧亚硝酸盐具有细胞毒性,氧化硫氧还蛋白 (thioredoxin, Trx) 导致细胞凋亡信号调节激酶 1 (apoptosis signal-regulated kinase 1, ASK1) 的活化^[2-3]。ASK1 与活化的混合谱系激酶 3 (mixed lineage kinase 3, MLK3) 通过丝裂原活化蛋白激酶激酶 4 (mitogen-activated protein kinase kinase 4, MKK4) 磷酸化将 c-jun *N* 末端激酶 (c-Jun *N*-terminal kinase, JNK) 激活为磷酸化形式,使磷酸化 JNK 易位至线粒体。磷酸化的 JNK 会通过 Src 介导的通路进一步抑制线粒体电子运输^[4-6]。B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白 (B-cell lymphoma-2 associated X protein, Bax) 和糖原合成激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 易位到线粒体,进一步激活线粒体氧化应激^[7]。这些会改变线粒体的通透性并释放线粒体膜间蛋白,如核酸内切酶 G、凋亡诱导因子 (apoptosis inducing factor, AIF)、细胞色素 C 和第 2 个线粒体衍生的半胱氨酸蛋白酶激活剂 (second mitochondria-derived activator of caspases, Smac)。AIF 和核酸内切酶 G 向细胞核的易位导致细胞核 DNA 断裂及细胞坏死,进而引起肝损伤。

儿茶素是存在于儿茶、罗布麻、银杏叶等药用植物中的多酚类化学物质^[8],具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化和抗病毒等多种药理作用^[9],可用于治疗心血

管^[10]、肝脏^[11]等疾病。关于儿茶素类化合物先前的研究表明,表儿茶素对 APAP 诱导的急性肝损伤具有保护作用,其作用机制为抗炎和抗细胞凋亡活性^[12]。表没食子儿茶素-3-没食子酸 (epigallocatechin-3-gallate, EGCG) 通过降低血清丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 活性、减轻氧化应激、抑制细胞凋亡和减少 APAP 的毒性产物,进而减轻 APAP 诱导的肝损伤^[13-14]。最近一项研究表明,EGCG 对肝脏的保护作用是通过降低 APAP 诱导的血清 ALT 活性,改善肝线粒体膜电位和呼吸链复合物^[15]。上述研究表明,儿茶素异构体可以减轻 APAP 诱导的肝毒性,但其具体作用机制尚未阐明。同样,关于儿茶素本身在 APAP 肝毒性中的作用和机制也鲜有报道。由于 JNK 在 APAP 诱导的肝毒性中起着关键作用,因此本研究旨在探讨儿茶素是否能够通过体内外调节 JNK 信号通路来减轻 APAP 诱导的肝毒性。

1 材料

1.1 动物和细胞

清洁级雄性 ICR 小鼠 36 只,8~10 周龄,体重 (25 $\pm$ 35) g,购自湖南斯莱克景达试验动物公司,合格证号 SCXK (湘) 2016-0002。动物饲养于温度 (22 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 、自动通风、明暗光照周期 12 h/12 h、相对湿度 (50 $\pm$ 5) % 的环境中,自由进食饮水,实验前适应性喂养 1 周。动物实验经宜春学院动物伦理委员会批准,批准号为伦审科第 2023 (035) 号。

人正常肝细胞 L02 由上海中医药大学季莉莉教授赠予。

1.2 药品与试剂

儿茶素(质量分数 $\geq 98.0\%$,批号 P10A8F41490)购自上海源叶生物科技有限公司;APAP(质量分数 $\geq 99.0\%$,批号 C10090929)购自上海麦克林生化科技有限公司;JNK 激活剂茴香霉素(批号 20191122)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)测定试剂盒(批号 20180321)、线粒体膜电位测定试剂盒(批号 20210708)、BCA 蛋白检测试剂盒(批号 37)均购自上海碧云天生物技术有限公司;RIPA 裂解缓冲液(批号 170319)购自美国 GIBCO 生物技术有限公司;Vivid®CYP2E1 检测试剂盒(批号 2833633)、Vivid®CYP3A4 检测试剂盒(批号 2834649)、Vivid®CYP1A2 检测试剂盒(批号 2830166)均购自赛默飞世尔科技有限公司;DDTC(批号 161910);酮康唑(批号 2102G48)均购自上海源叶生物科技有限公司;呋拉茶碱(批号 ST023)购自范德生物科技有限公司;ALT 检测试剂盒(批号 20200306)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)检测试剂盒(批号 20200404)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒(批号 20210610)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)测定试剂盒(批号 20210925)、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)检测试剂盒(批号 20220106)、线粒体呼吸链复合体 I 测定试剂盒(批号 20201215)、线粒体提取试剂盒(批号 10124339)均购自南京建成生物工程有限公司; β -actin 抗体(批号 15)、细胞色素 C 氧化酶 IV(cytochrome c oxidase IV, COX IV)抗体(批号 4)、Bax 抗体(批号 12)、AIF 抗体(批号 3)、Smac 抗体(批号 1)、T-JNK 抗体(批号 15)、p-JNK 抗体(批号 15)、动力相关蛋白 1(dynamain-related protein 1, Drp1)抗体(批号 3)、线粒体融合蛋白 2(mitofusin 2, Mfn2)抗体(批号 3)、二抗(批号 10)购自美国 CST 公司;其他试剂均为分析试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 仪器

Ti2-U 型荧光显微镜(日本 Nikon 公司);2IR 型高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技有限公司);BWS-10 型恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);1681130A 型 Imark 酶标仪、703930 型蛋白电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);S10 型手提式高速分散器(宁波新芝生物科技股份有限公司);AR224CN 型电子天平(上海奥豪斯仪器有限公司);VORTEX-5 型漩涡混合仪(上海析域仪器设备有限公司);722 型可见光分光

光度计(上海佑可仪表有限公司);HP 型 AlphaImager 凝胶成像系统(美国 Alpha 科技有限公司);IMS-20 型雪花制冰机(常熟市雪科电器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

36 只 ICR 小鼠适应性饲养 1 周后,随机分为对照组、模型组和儿茶素低、高剂量(50、100 mg/kg)组,每组 9 只。APAP 溶于温热无菌生理盐水溶液中,儿茶素溶于 0.01% PBS 溶液中。儿茶素组小鼠连续 3 d ig 药物,对照组给予等体积的生理盐水,末次给药 1 h 后模型组和儿茶素组小鼠 ip APAP(400 mg/kg),对照组 ip 等体积的生理盐水,6 h 后麻醉,心脏取血,采集肝脏。

2.2 血清 ALT 和 AST 活性检测

将各组小鼠血液置于冰上 3 h,4 °C、3 500 r/min 离心 10 min,取上清液,按照试剂盒说明书测定血清中 ALT 和 AST 活性。

2.3 肝组织苏木素-伊红(HE)染色

将小鼠肝大叶置于 10%中性福尔马林溶液中固定,石蜡包埋,切片后进行 HE 染色,于显微镜下观察并拍照,采用 Suzuki 评分^[16]对肝组织结构损伤程度进行半定量分析。

2.4 肝脏 SOD 活性和 GSH 水平测定

取各组肝组织适量,加入 9 倍量的生理盐水,匀浆后 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,采用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。按照试剂盒说明书测定肝组织中 SOD 活性和 GSH 水平。

2.5 细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 代谢酶活性测定

将制备好的肝微粒体加入不同浓度的儿茶素(0.3、1、3、10、30、100 $\mu\text{mol/L}$),按照试剂盒说明书分析儿茶素对 CYP2E1、CYP1A2 和 CYP3A4 酶活性的影响。DDTC、呋拉茶碱和酮康唑为细胞色素 P4502E1、P4503A4、P4501A2 的阳性抑制剂,计算阳性抑制剂的抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - (X - B) / (A - B)$$

X、A 和 B 分别代表儿茶素、溶剂对照和阳性抑制剂的速率

2.6 儿茶素对 APAP 诱导的 L02 细胞氧化应激、线粒体损伤和 p-JNK 蛋白表达的影响

2.6.1 细胞培养 L02 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,在 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。

2.6.2 ROS 水平的测定 将 L02 细胞以 1×10^5 个/孔

接种于 6 孔板中, 设置对照组、模型组和儿茶素低、高剂量 (40、80 $\mu\text{mol/L}$) 组。待细胞贴壁后, 儿茶素组分别加入不同浓度的儿茶素溶液孵育 15 min, 然后模型组和儿茶素组再加入 APAP (15 mmol/L) 孵育 6 h。加入 DCFH-DA 探针孵育 20 min, 于荧光显微镜下检测荧光强度。

2.6.3 线粒体膜电位的测定 按照“2.6.2”项下方法进行分组和给药, 药物处理后, 弃去培养液, PBS 清洗细胞, 加入 0.5 mL 细胞培养液和 0.5 mL JC-1 染色工作液, 充分混匀。将孔板放于细胞培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 随后吸弃培养液, 各孔用 1 mL JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次, 并加入 1 mL 细胞培养液于荧光显微镜下观察线粒体荧光的强弱。

2.6.4 细胞中 ATP 含量的测定 L02 细胞以 2×10^6 个接种于直径为 6 cm 的培养皿中, 待细胞贴壁后, 加入 APAP (15 mmol/L) 分别孵育 0、6、12、18、24 h, 按 ATP 检测试剂盒说明书检测 ATP 含量, 用可见光分光光度计于 636 nm 处检测各组吸光度 (A) 值, 计算 ATP 含量。

L02 细胞以 2×10^6 个接种于直径为 6 cm 的培养皿中, 设置对照组、模型组及儿茶素低、高剂量 (40、80 $\mu\text{mol/L}$) 组和儿茶素 (80 $\mu\text{mol/L}$) 单独给药组。待细胞贴壁后, 儿茶素组分别加入不同浓度的儿茶素溶液孵育 15 min, 然后模型组和儿茶素组再加入 APAP (15 mmol/L) 孵育 6 h。按 ATP 检测试剂盒说明书检测 ATP 含量。

2.6.5 线粒体呼吸链复合物 I 活性的测定 L02 细胞以 2×10^6 个接种于直径为 6 cm 的培养皿中, 按照“2.6.2”项下方法进行分组, 待细胞贴壁后, 儿茶素组分别加入不同浓度的儿茶素溶液孵育 15 min, 然后模型组和儿茶素组再加入 APAP (15 mmol/L) 孵育 6 h。使用线粒体提取试剂盒提取线粒体。复合物 I 会催化还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) 转化为烟酰胺腺嘌呤四核苷酸。因此, 根据试剂盒说明书, 通过测量 340 nm 处 A 值来计算线粒体呼吸链复合物 I 活性, 以确定 NADH 的转化率。

2.6.6 Western blotting 检测胞浆 Bax、Smac、AIF 和线粒体 Mfn2、Drp1、Bax 蛋白表达 L02 细胞以 2×10^6 个接种于直径为 6 cm 的培养皿中, 设置对照组、模型组及儿茶素低、高剂量 (40、80 $\mu\text{mol/L}$) 组和儿茶素 (80 $\mu\text{mol/L}$) 单独给药组。待细胞贴壁后, 儿茶素组分别加入不同浓度的儿茶素溶液孵育

15 min, 然后模型组和儿茶素组再加入 APAP (15 mmol/L) 孵育 6 h。收集细胞, 用 RIPA 裂解缓冲液提取胞质蛋白, 线粒体提取试剂盒提取线粒体蛋白。测定蛋白浓度, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 孵育一抗和二抗, 使用化学发光试剂盒显影, 使用 β -actin 或 COX IV 作为内部参照, 对蛋白条带的灰度进行量化分析。

2.6.7 Western blotting 检测细胞 p-JNK、JNK 蛋白表达 L02 细胞以 2×10^6 个接种于直径为 6 cm 的培养皿中, 待细胞贴壁后, 加入 APAP (15 mmol/L) 分别孵育 0、0.5、1、3、6、12、24 h, 收集细胞, 用 RIPA 裂解缓冲液提取细胞总蛋白, 检测 p-JNK、JNK 蛋白表达。

按“2.6.6”项下方法处理细胞和给药, 收集细胞, 用 RIPA 裂解缓冲液提取细胞总蛋白, 检测 p-JNK、JNK 蛋白表达。

2.7 JNK 激活剂茴香霉素对儿茶素保护肝细胞作用的影响

L02 细胞以 2×10^6 个接种于直径为 6 cm 的培养皿中, 设置对照组、模型组和茴香霉素低、高剂量单独给药 (5、15 nmol/L) 组。待细胞贴壁后, 先用茴香霉素孵育 15 min, 然后加入 APAP (15 mmol/L) 孵育 6 h。收集细胞, 收集细胞, 提取蛋白, 检测 p-JNK、JNK 蛋白表达。

设置对照组、模型组、儿茶素 (80 $\mu\text{mol/L}$) 组和儿茶素+茴香霉素 (15 nmol/L) 组, 细胞先加入茴香霉素孵育 15 min, 再加入儿茶素孵育 15 min, 然后加入 APAP 孵育 6 h。采用 CCK-8 法测定细胞活力, 按照“2.6.3”项下方法测定线粒体膜电位水平, 按照“2.6.4”项下方法测定细胞中 ATP 含量, 按照“2.6.5”项下方法测定线粒体呼吸链复合物 I 活性, 按照“2.6.6”项下方法测定胞浆 Bax、Smac、AIF 和线粒体 Mfn2、Drp1、Bax 蛋白表达, 按照“2.6.7”项下方法检测 p-JNK、JNK 蛋白表达。

2.8 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异通过非参数单因素方差分析 (ANOVA) 进行评估, 当 ANOVA 发现 F 的显著值没有特质性差异时, 再进行最小显著差异 (LSD) 事后检验。否则, 进行 Mann-Whitney U 非参数方差分析。

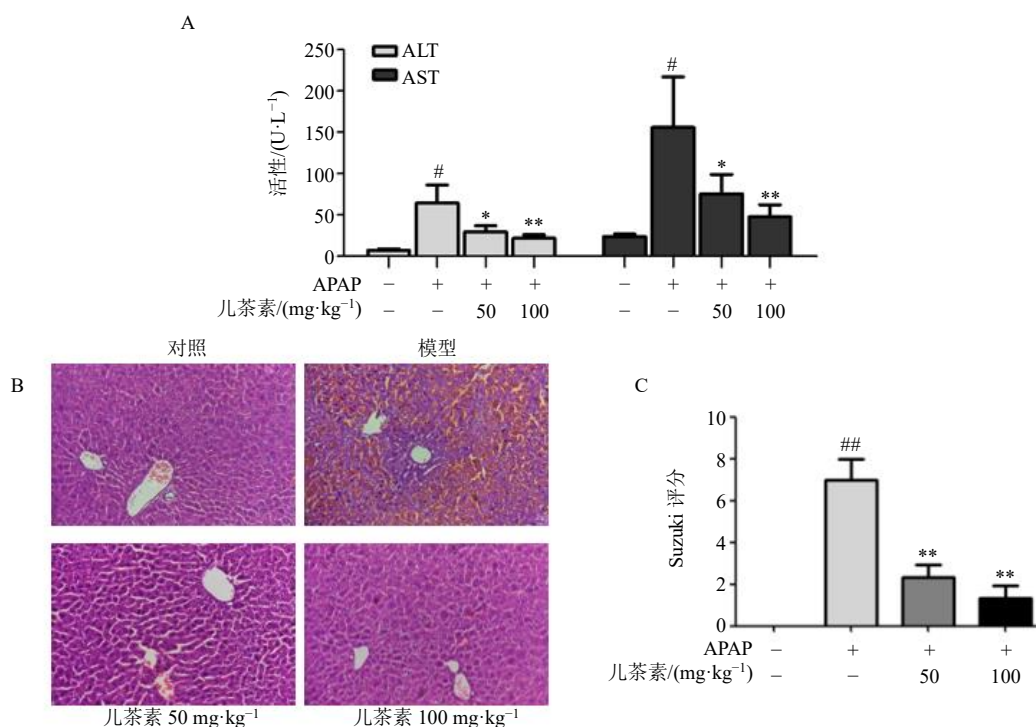
3 结果

3.1 儿茶素减轻 APAP 诱导的小鼠肝损伤

为了确定小鼠肝损伤的程度, 检测血清中 ALT

和 AST 活性。如图 1-A 所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中 ALT 和 AST 活性均显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,儿茶素 (50、100 mg/kg) 组小鼠血清中 ALT 和 AST 活性均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。HE 染色结果如图 1-B、C 所示,与对照组比

较,模型组小鼠血管周围肝脏组织结构遭到大面积的破坏,实质性肝小叶中心坏死、肝窦充血, Suzuki 评分明显升高 ($P < 0.01$);给予儿茶素后,肝脏组织损伤得到明显的改善, Suzuki 评分明显降低 ($P < 0.01$)。



A-小鼠血清中 ALT 和 AST 活性; B-小鼠肝组织 HE 染色病理学评估 ($\times 200$); 与对照组比较: $^{\#}P < 0.05$ $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ 。

A-ALT and AST activities in serum of mice; B-pathological assessment of HE staining of liver tissue in mice ($\times 200$); $^{\#}P < 0.05$ $^{##}P < 0.01$ vs control group; $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group.

图 1 儿茶素对 APAP 诱导的小鼠肝损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 1 Effect of catechin on APAP-induced liver injury in mice ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

3.2 儿茶素对 APAP 代谢酶活性的影响

CYP2E1、CYP1A2 和 CYP3A4 是 CYP450 体系中的一员,它们在 APAP 的代谢活化中起重要作用^[17]。如图 2 所示,儿茶素对 CYP2E1 和 CYP1A2

酶活性没有影响。低浓度的儿茶素对 CYP3A4 活性无影响,而高浓度(100 $\mu\text{mol/L}$)的儿茶素对 CYP3A4 活性具有一定的抑制作用,但与阳性对照组相比均无统计意义。

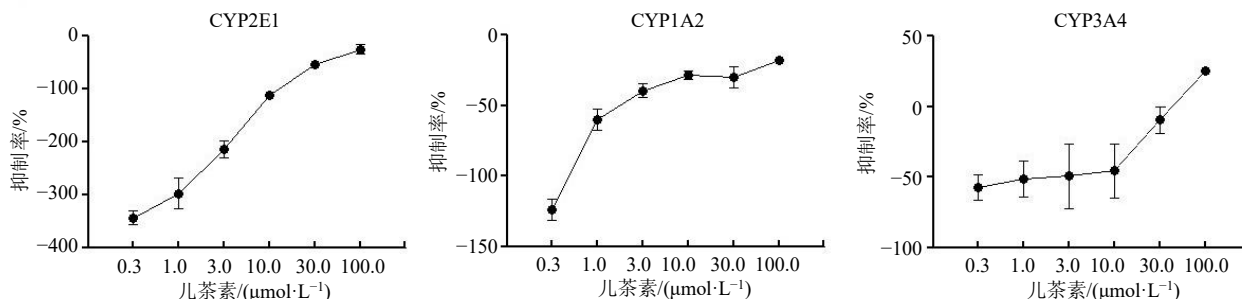


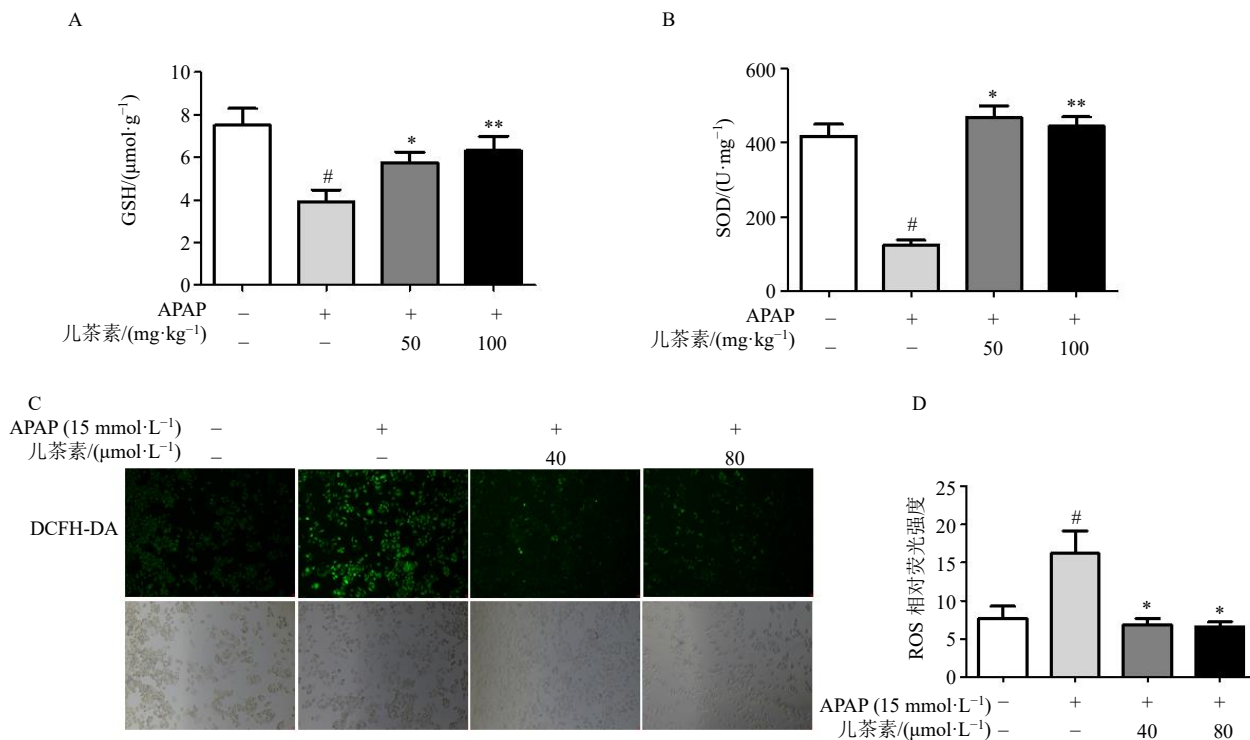
图 2 儿茶素对 CYP450 代谢酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of catechin on activity of CYP450 metabolic enzymes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 儿茶素减轻 APAP 诱导的氧化应激

SOD 和 GSH 是机体重要的抗氧化剂。如图 3-A、B 所示,与对照组比较,模型组小鼠肝组织 GSH 水平和 SOD 活性均显著降低 ($P<0.05$);与模型组比较,儿茶素 (50、100 mg/kg) 组小鼠肝组织 GSH 水平和 SOD 活性均显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。

ROS 水平的增加与线粒体氧化应激有关。用荧光染色法检测儿茶素对 APAP 诱导的 L02 细胞氧化应激的抗氧化作用。如图 3-C、D 所示,与对照组比较,APAP 显著增加细胞 ROS 含量 ($P<0.05$),儿茶素 (40、80 $\mu\text{mol/L}$) 可以显著降低 APAP 诱导的 ROS 含量 ($P<0.05$)。



A-小鼠肝脏中 GSH 水平; B-小鼠肝脏中 SOD 活性; C、D-L02 细胞给予 40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 儿茶素, 15 min 后给予 15 mmol·L⁻¹ APAP 孵育 6 h, 检测 ROS 水平 ($\times 100$); 与对照组比较: # $P<0.05$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

A-GSH level in liver of mice; B-SOD activity in liver of mice; C, D-L02 cells were given 40 and 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ catechin for 15 min, and then incubated with 15 mmol·L⁻¹ APAP for 6 h to detect ROS level ($\times 100$); # $P<0.05$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group.

图 3 儿茶素对 APAP 诱导的氧化应激的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Fig. 3 Effect of catechin on APAP induced oxidative stress ($\bar{x} \pm s, n=9$)

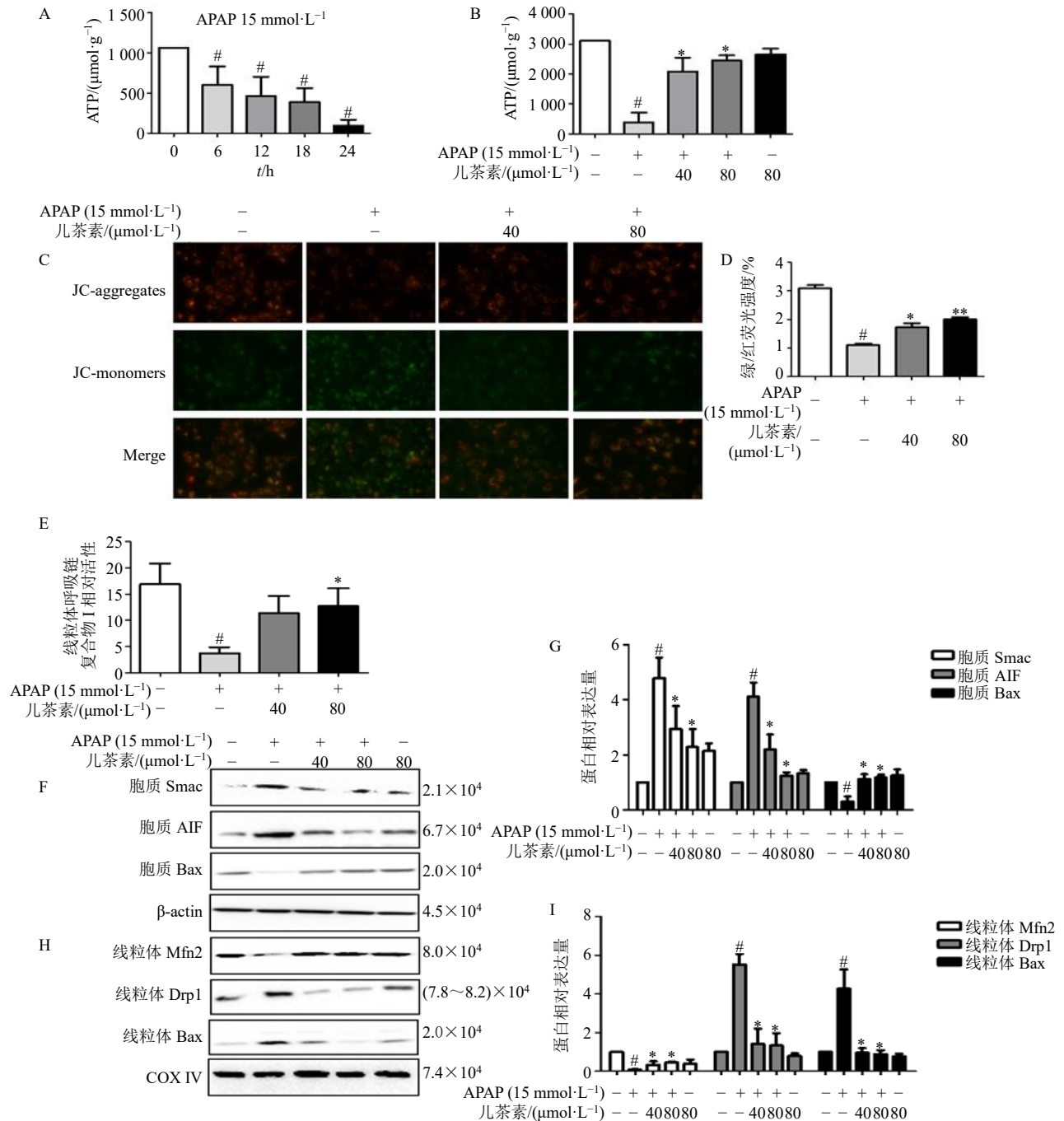
3.4 儿茶素减轻 APAP 诱导的线粒体损伤

细胞给予 APAP (15 mmol/L) 分别孵育 0、6、12、18、24 h, 检测 ATP 浓度。如图 4-A 所示, APAP (15 mmol/L) 在 24 h 内呈时间相关性降低 ATP 浓度 ($P<0.05$)。细胞用儿茶素 (40、80 $\mu\text{mol/L}$) 处理 15 min, 然后给予 APAP (15 mmol/L) 孵育 6 h, 如图 4-B 所示, 与模型组比较, 儿茶素 (40、80 $\mu\text{mol/L}$) 组 ATP 浓度显著升高 ($P<0.05$)。如图 4-E 所示, 与模型组比较, 儿茶素 (80 $\mu\text{mol/L}$) 组线粒体呼吸链复合物 I 活性明显增加 ($P<0.05$)。结果表明, 过量的 APAP 导致线粒体呼吸链复合体 I 活性显著降低, 用儿茶素预处理可以恢复线粒体呼

吸链复合物 I 的活性。

红色 (聚集体)/绿色 (单体) 荧光强度比的降低表明线粒体膜损伤导致去极化。如图 4-C、D 所示, 模型组观察到绿色荧光强度增加, 40、80 $\mu\text{mol/L}$ 儿茶素预处理导致 APAP 处理的细胞中红色荧光显著增加 ($P<0.05$ 、 0.01)。以上结果表明儿茶素处理可阻止线粒体膜的去极化。

Bax、Smac 和 AIF 是细胞凋亡相关蛋白。Bax 可以转移到线粒体并在线粒体外膜上形成孔隙, 过量的 APAP 可导致膜间蛋白 Smac 和 AIF 的释放。如图 4-F、G 所示, 与对照组比较, 模型组胞质中 AIF 和 Smac 蛋白表达水平平均显著升高 ($P<0.05$),



A-L02 细胞给予 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ APAP 孵育 0、6、12、18、24 h, 检测 ATP 浓度; B-L02 细胞给予 40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 儿茶素, 15 min 后给予 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ APAP 孵育 6 h, 检测 ATP 浓度; C、D-L02 细胞给予 40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 儿茶素, 15 min 后给予 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ APAP 孵育 6 h, 检测线粒体膜电位变化; E-L02 细胞给予 40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 儿茶素, 15 min 后给予 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ APAP 孵育 6 h, 检测线粒体呼吸链复合物 I 活性; F~I-L02 细胞给予 40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 儿茶素, 15 min 后给予 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ APAP 孵育 6 h, 检测胞质 Bax、Smac、AIF 和线粒体 Mfn2、Drp1、Bax 蛋白表达; 与对照组比较: # $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

A-L02 cells were incubated with 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ APAP for 0, 6, 12, 18, 24 h to detect ATP concentration; B-L02 cells were given 40 and 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ catechin for 15 min, and then incubated with 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ APAP for 6 h to detect ATP concentration; C, D-L02 cells were given 40 and 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ catechin for 15 min, and then incubated with 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ APAP for 6 h to detect changes of mitochondrial membrane potential; E-L02 cells were given 40 and 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ catechin for 15 min, and then incubated with 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ APAP for 6 h to detect activity of mitochondrial respiratory chain complex I; F~I-L02 cells were given 40 and 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ catechin for 15 min, and then incubated with 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ APAP for 6 h to detect protein expressions of cytoplasmic Bax, Smac, AIF and mitochondrial Mfn2, Drp1, and Bax; # $P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group.

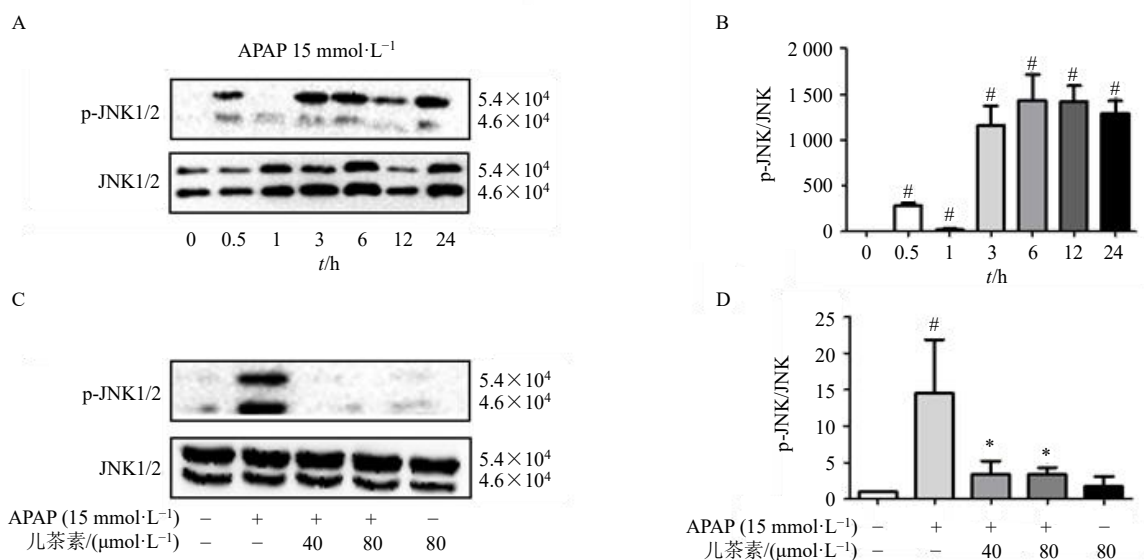
图 4 儿茶素对 APAP 诱导线粒体损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of catechin on APAP-induced mitochondrial damage ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Bax 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 而 APAP 联合儿茶素组以上蛋白表达水平平均显著回调 ($P < 0.05$)。Mfn2 和 Drp1 蛋白参与线粒体融合和分裂, 在肝毒性过程中可以控制 JNK 的激活并影响氧化应激。如图 4-H、I 所示, 与对照组比较, 模型组线粒体中 Mfn2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), Bax 和 Drp1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 而用儿茶素处理则显著回调以上蛋白表达 ($P < 0.05$)。以上结果表明儿茶素可以预防 APAP 诱导的线粒体功能紊乱。

3.5 儿茶素抑制 APAP 诱导的 L02 细胞中 JNK 蛋白的磷酸化

首先考察 L02 细胞给予 APAP 孵育不同时间点对 JNK 蛋白磷酸化的影响。如图 5-A、B 所示, APAP (15 mmol/L) 孵育 6 h, JNK 蛋白的磷酸化水平最高 ($P < 0.05$)。接下来考察儿茶素对 APAP 诱导的 L02 细胞中 JNK 蛋白磷酸化的影响。如图 5-C、D 所示, 儿茶素预处理显著降低了 p-JNK 的表达 ($P < 0.05$)。表明儿茶素预处理降低了 APAP 诱导的 L02 细胞 p-JNK 蛋白的表达。



A、B-L02 细胞给予 15 mmol·L⁻¹ APAP 分别孵育 0、0.5、1、3、6、12、24 h, 检测 p-JNK、JNK 蛋白表达; C、D-L02 细胞给予 40、80 μmol·L⁻¹ 儿茶素, 15 min 后给予 15 mmol·L⁻¹ APAP 孵育 6 h, 检测 p-JNK、JNK 蛋白表达; 与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ 。
A, B-L02 cells were incubated with 15 mmol·L⁻¹ APAP for 0, 0.5, 1, 3, 6, 12, 24 h to detect p-JNK, JNK protein expressions; C, D-L02 cells were given 40 and 80 μmol·L⁻¹ catechin for 15 min, and then incubated with 15 mmol·L⁻¹ APAP for 6 h to detect p-JNK, JNK protein expressions; [#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group.

图 5 儿茶素对 APAP 诱导的 L02 细胞中 JNK 蛋白磷酸化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of catechin on phosphorylation of JNK protein in APAP-induced L02 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

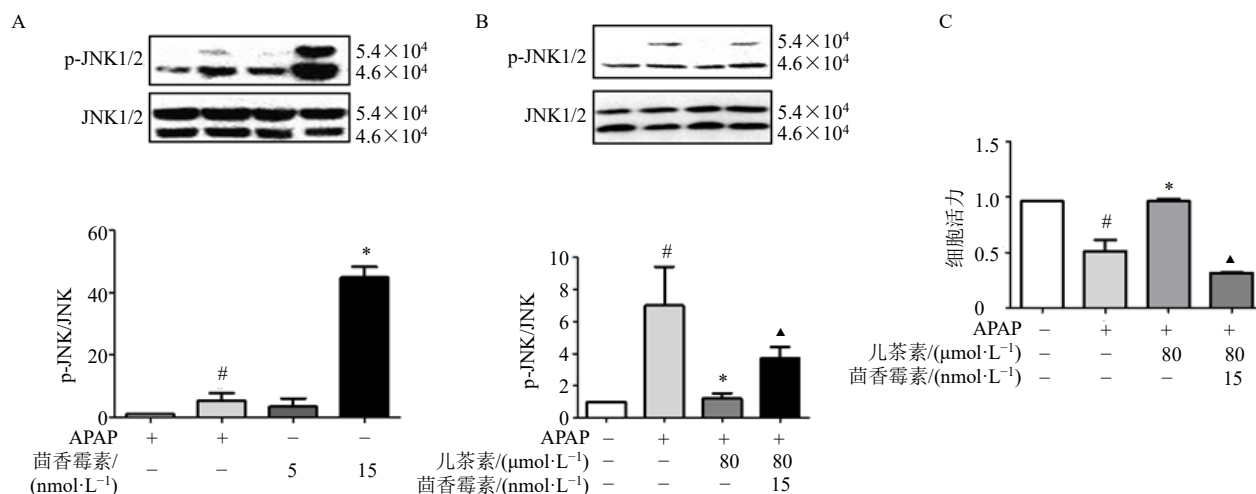
3.6 JNK 激活剂茴香霉素减弱儿茶素对肝细胞的保护作用

为了进一步证实儿茶素对 JNK 通路活性的影响, 本研究使用 JNK 激活剂茴香霉素对细胞进行干预^[18]。先将细胞用 JNK 激活剂茴香霉素 (5、15 nmol/L) 孵育 15 min, 再用儿茶素 (40、80 μmol/L) 孵育 15 min, 然后再加入 APAP 孵育 6 h。如图 6-A 所示, 15 nmol/L 茴香霉素显著增加了 p-JNK 的蛋白表达 ($P < 0.05$)。如图 6-B 所示, 与模型组比较, 儿茶素组 p-JNK 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 而给予 JNK 激活剂后, p-JNK 蛋白表达水平显著升

高 ($P < 0.05$)。为了探讨儿茶素对茴香霉素处理的 L02 细胞的保护作用, 对细胞活力进行测定。如图 6-C 所示, APAP (15 mmol/L) 显著降低细胞活力 ($P < 0.05$), 儿茶素预处理后能够显著回调细胞活力 ($P < 0.05$)。在加入茴香霉素后, 细胞活力显著降低 ($P < 0.05$)。以上结果表明, JNK 信号通路是儿茶素拮抗 APAP 诱导的肝损伤的关键所在。

3.7 茴香霉素减弱儿茶素对线粒体的保护作用

为检测 JNK 激活剂茴香霉素对线粒体功能的影响, 对 ATP 含量、线粒体膜电位、线粒体呼吸链复合物 I 活性、胞质中 Smac、AIF、Bax 以及线粒



A-L02 细胞给予 JNK 激活剂茴香毒素 (5、15 mmol·L⁻¹) 孵育 15 min, 再加入 15 mmol·L⁻¹ APAP 孵育 6 h, 检测 p-JNK、JNK 蛋白表达; B-L02 细胞给予 15 mmol·L⁻¹ 茴香毒素孵育 15 min, 再给予 80 μmol·L⁻¹ 儿茶素孵育 15 min, 然后给予 15 mmol·L⁻¹ APAP 孵育 6 h, 检测 p-JNK、JNK 蛋白表达; C-L02 细胞给予 15 mmol·L⁻¹ 茴香毒素孵育 15 min, 再给予 80 μmol·L⁻¹ 儿茶素孵育 15 min, 然后给予 15 mmol·L⁻¹ APAP 孵育 6 h, 检测细胞活力; 与对照组比较: [#]*P*<0.05; 与模型组比较: ^{*}*P*<0.05; 与 APAP+儿茶素组比较: [▲]*P*<0.05。

A-L02 cells were incubated with 5 and 15 mmol·L⁻¹ JNK activator anisomycin for 15 min, and then incubated with 15 mmol·L⁻¹ APAP for 6 h to detect p-JNK, JNK protein expressions; B-L02 cells were incubated with 15 mmol·L⁻¹ anisomycin for 15 min, and given 80 μmol·L⁻¹ catechin for 15 min, and then incubated with 15 mmol·L⁻¹ APAP for 6 h to detect p-JNK, JNK protein expressions; C-L02 cells were incubated with 15 mmol·L⁻¹ anisomycin for 15 min, and given 80 μmol·L⁻¹ catechin for 15 min, and then incubated with 15 mmol·L⁻¹ APAP for 6 h to detect cell viability; [#]*P*<0.05 vs control group; ^{*}*P*<0.05 vs model group; [▲]*P*<0.05 vs APAP + catechin group.

图 6 JNK 激活剂对儿茶素拮抗 APAP 致肝细胞毒性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of JNK activator on catechin antagonizing APAP-induced liver cell toxicity ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

体中 Mfn2、Drp1、Bax 蛋白表达进行检测。如图 7 所示, 茴香毒素显著逆转了儿茶素对 ATP 含量、线粒体呼吸链复合物 I 活性、线粒体膜电位、胞质中 Smac、AIF、Bax 以及线粒体中 Mfn2、Drp1、Bax 蛋白表达的调控作用 (*P*<0.05、0.01)。以上结果表明儿茶素可以通过抑制 JNK 信号通路来减轻 APAP 诱导的线粒体损伤。

4 讨论

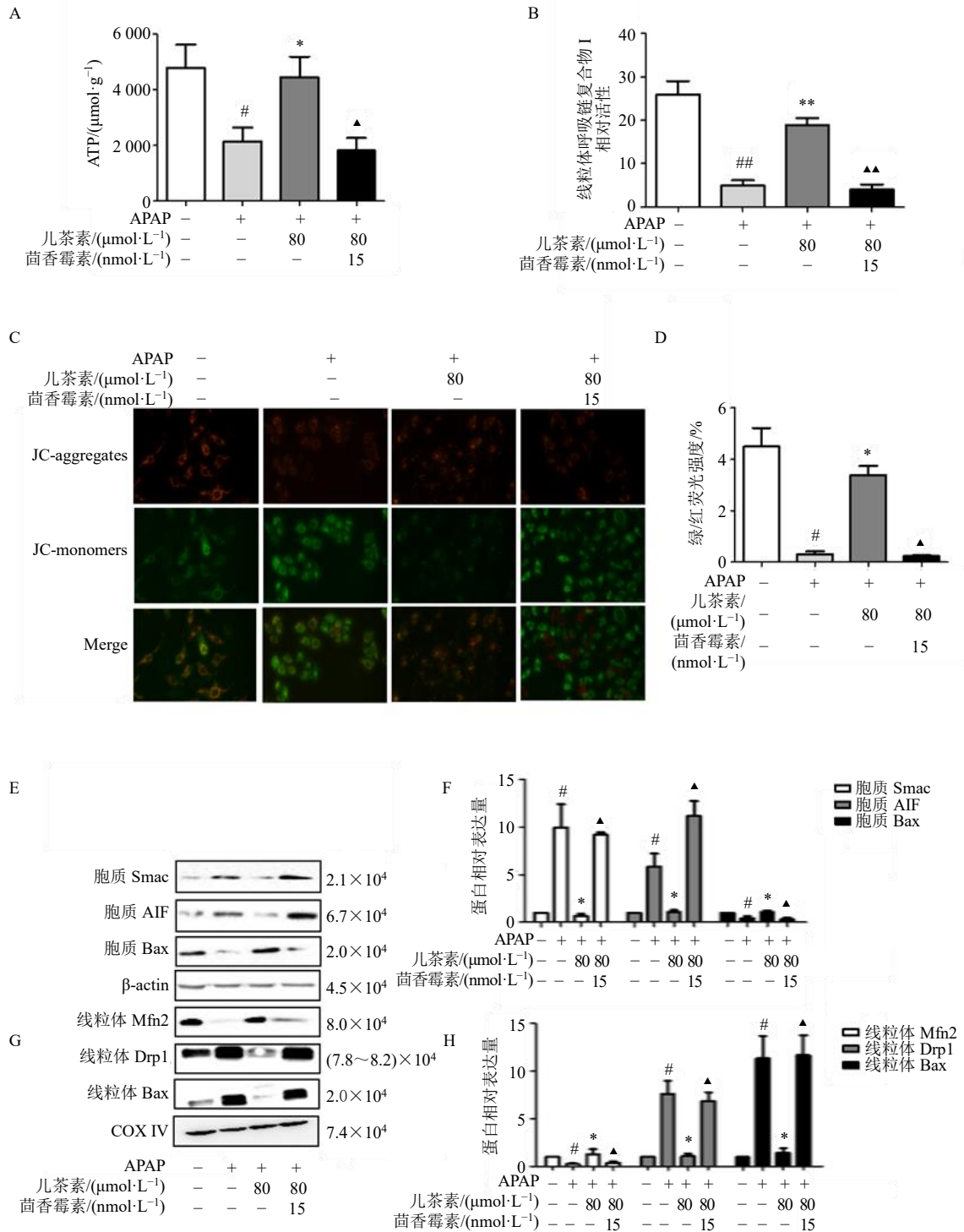
ALT 和 AST 主要存在于肝细胞中^[19]。如果肝脏受到损伤, 血液中 ALT 和 AST 活性会急剧升高。因此, ALT 和 AST 被认为是急性肝损伤的标志物^[20]。在本研究中, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 ALT 和 AST 活性均显著升高, 并导致肝脏发生严重的组织病理学变化。给予儿茶素后, 呈剂量相关性地降低了血清 ALT 和 AST 活性。表明儿茶素在 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤中具有显著的保肝作用。

当摄入过量 APAP 时, 会引起 CYP450 酶被激活, 产生反应性代谢产物 *N*-乙酰基-对苯并醌亚胺 (*N*-acetyl-para-amino-phenol, NAPQI)^[21-22]。CYP450 在 APAP 肝毒性中起关键作用是由于 CYP450 的几种亚型如 CYP2E1、CYP1A2 和 CYP3A4 参与 APAP 代谢^[17]。因此, 本研究探究了儿茶素对 CYP2E1、

CYP1A2 和 CYP3A4 酶活性的影响。结果表明, 100 μmol/L 儿茶素仅能抑制 CYP3A4 的活性, 对 CYP2E1、CYP1A2 没有影响。这说明抑制 APAP 的代谢酶只是儿茶素减轻肝毒性机制的一小部分。

大量研究表明, 线粒体氧化应激是 APAP 诱导肝损伤的重要因素^[23]。氧化应激的产生是体内氧化和抗氧化作用的失衡^[24]。儿茶素可通过提高 GSH 水平和 SOD 活性, 降低 ROS 水平, 从而发挥保肝作用。氧化应激中会产生过量的 ROS 和自由基^[25]。GSH 是体内重要的抗氧化剂和自由基清除剂^[26]。SOD 的作用机制主要是清除对身体有害的超氧阴离子和自由基^[27]。在本研究中, 观察到肝损伤小鼠体内 GSH 水平和 SOD 活性较低, ROS 水平升高, 而经儿茶素处理后显著降低了 GSH 和 SOD 的消耗以及 ROS 的水平。这表明儿茶素的保肝作用与其抗氧化能力有关。

ATP 是生物体内能量转化最基本的载体, 其含量的变化直接关系到各器官的能量代谢^[28]。线粒体可以从产生 ATP 的分解代谢细胞器转变为产生 ATP 的合成代谢细胞器^[29]。因此, 线粒体是细胞 ATP 最有效的来源。线粒体功能障碍是由细胞凋亡过程中 ATP 水平的改变和线粒体膜电位下降所引起的^[30]。



A-L02 细胞给予 $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 茴香霉素孵育 15 min, 再给予 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 儿茶素孵育 15 min, 然后给予 $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ APAP 孵育 6 h, 检测 ATP 含量; B-线粒体呼吸链复合物 I 活性; C、D-线粒体膜电位; E~H-胞质 Bax、Smac、AIF 和线粒体 Mfn2、Drp1、Bax 蛋白表达; 与对照组比较: $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$; 与模型组比较: $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$; 与 APAP+儿茶素组比较: $^{\Delta}P < 0.05$ $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。

A-L02 cells were incubated with $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ anisomycin for 15 min, and given $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ catechin for 15 min, and then incubated with $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ APAP for 6 h to detect ATP content; B-mitochondrial respiratory chain complex I activity; C, D-mitochondrial membrane potential; E~H-protein expressions of cytoplasmic Bax, Smac, AIF and mitochondrial Mfn2, Drp1, and Bax; $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ vs control group; $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group; $^{\Delta}P < 0.05$ $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ vs APAP+catechin group.

图 7 JNK 激活剂对儿茶素保护线粒体的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of JNK activator on protection of mitochondria by catechin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

研究表明, 儿茶素可以通过改善线粒体功能和生物能量学来预防线粒体功能障碍和有氧能量代谢的受损^[31]。本研究结果表明, 儿茶素预处理不仅提高了 ATP 水平, 还恢复了线粒体膜电位, 降低了与线粒体损伤相关的凋亡相关蛋白如 AIF 和 Bax 的表达。

线粒体呼吸链复合体是线粒体内膜中电子传输链的重要组成部分^[32]。线粒体呼吸链复合物 I 活性的降低会影响电子传输并增加 ROS 水平, 导致线粒体功能障碍^[33]。研究表明, APAP 会干扰线粒体呼吸链复合物的形成, 导致 ATP 水平下降、ROS 活性增加, 从而引起肝损伤^[34]。本结果表明儿茶素预处理增加了线粒体呼吸链复合物 I 的活性。因此, 恢复线粒体呼吸链复合物 I 的活性可能是治疗 APAP 诱导的急性肝损伤的有效方法。

JNK 信号通路的激活被认为是 APAP 诱导的肝损伤的重要机制^[35]。ROS 可激活 JNK 信号通路, 增加线粒体膜通透性。ROS 的产生和 JNK 的激活形成了正反馈循环, 因此会增加氧化性损伤^[36]。先前的研究表明, JNK 的激活可导致 Bax 激活并易位到线粒体, 并在线粒体外膜中形成孔隙, 然后引起线粒体膜间蛋白 Smac 和 AIF 释放, 导致 DNA 断裂^[37-39]。本研究结果表明, 在 APAP 处理的肝细胞中, p-JNK 水平显著升高, 而儿茶素的保护作用在 JNK 激活剂处理后显著减弱。这说明儿茶素对 JNK 的抑制作用在 APAP 诱导的肝损伤中至关重要。

综上, 本研究表明儿茶素在体内外均能抑制 APAP 诱导的肝损伤。在体内, 儿茶素可以降低 ALT 和 AST 活性, 减少肝组织损伤, 并增加肝脏 GSH 水平和 SOD 活性, 从而降低氧化应激; 在体外, 儿茶素可以提高人肝细胞的存活率以及线粒体中膜电位、线粒体呼吸链复合物 I 活性和 ATP 水平。进一步的研究结果表明儿茶素对肝损伤的保护作用与其对 JNK 的抑制有关。目前的文献多是对儿茶素类化合物如表儿茶素、EGCG^[40]等化合物保肝作用的研究, 对儿茶素的保肝作用研究鲜有报道, 本研究从体内外系统阐释了儿茶素拮抗 APAP 的肝损伤的作用, 并利用信号分子抑制剂对其保肝机制进行了较为深入的研究。但由于条件限制未在转基因动物上进一步验证, 这也将是后续的研究内容之一。本研究为儿茶素的保肝作用提供了实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Shehu A I, Ma X C, Venkataramanan R. Mechanisms of

drug-induced hepatotoxicity [J]. *Clin Liver Dis*, 2017, 21(1): 35-54.

[2] Ramachandran A, Lebofsky M, Yan H M, *et al*. Hepatitis C virus structural proteins can exacerbate or ameliorate acetaminophen-induced liver injury in mice [J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(5): 773-783.

[3] Jan Y H, Heck D E, Dragomir A C, *et al*. Acetaminophen reactive intermediates target hepatic thioredoxin reductase [J]. *Chem Res Toxicol*, 2014, 27(5): 882-894.

[4] Hanawa N, Shinohara M, Saberi B, *et al*. Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(20): 13565-13577.

[5] Saito C, Lemasters J J, Jaeschke H. C-Jun N-terminal kinase modulates oxidant stress and peroxynitrite formation independent of inducible nitric oxide synthase in acetaminophen hepatotoxicity [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 246(1/2): 8-17.

[6] Win S, Than T A, Han D, *et al*. C-Jun N-terminal kinase (JNK)-dependent acute liver injury from acetaminophen or tumor necrosis factor (TNF) requires mitochondrial Sab protein expression in mice [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(40): 35071-35078.

[7] Shinohara M, Ybanez M D, Win S, *et al*. Silencing glycogen synthase kinase-3 β inhibits acetaminophen hepatotoxicity and attenuates JNK activation and loss of glutamate cysteine ligase and myeloid cell leukemia sequence 1 [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(11): 8244-8255.

[8] Musial C, Kuban-Jankowska A, Gorska-Ponikowska M. Beneficial properties of green tea catechins [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1744.

[9] 徐先祥. 儿茶素的药理作用研究综述 [J]. *轻工学报*, 2012, 27(4): 60-64.

[10] 颜俊杰, 黄静雯, 金陆飞, 等. 儿茶素应用于心血管疾病的研究进展 [J]. *四川生理科学杂志*, 2018, 40(4): 316-318.

[11] 万星, 陶柏楠, 邵文翠, 等. 儿茶素干预硬脂酰辅酶 A 去饱和酶-1 表达抗小鼠肝纤维化损伤 [J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(2): 305-310.

[12] Wu H, Xie Y N, Xu Y L, *et al*. Protective effect of epicatechin on APAP-induced acute liver injury of mice through anti-inflammation and apoptosis inhibition [J]. *Nat Prod Res*, 2020, 34(6): 855-858.

[13] Yao H T, Li C C, Chang C H. Epigallocatechin-3-gallate reduces hepatic oxidative stress and lowers CYP-mediated bioactivation and toxicity of acetaminophen in rats [J]. *Nutrients*, 2019, 11(8): 1862.

[14] Yao H T, Yang Y C, Chang C H, *et al*. Protective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate against acetaminophen-induced liver injury in rats [J]. *BioMedicine*, 2015, 5(3):

- 15.
- [15] Lin Y X, Huang J, Gao T F, *et al.* Preliminary study on hepatoprotective effect and mechanism of (–)-epigallocatechin-3-gallate against acetaminophen-induced liver injury in rats [J]. *Iran J Pharm Res*, 2021, 20(3): 46-56.
- [16] Suzuki S, Toledo-Pereyra L H, Rodriguez F J, *et al.* Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine [J]. *Transplantation*, 1993, 55(6): 1265-1272.
- [17] Xiong W, Huang J, Li X Y, *et al.* Icaritin and its phosphorylated derivatives alleviate intestinal epithelial barrier disruption caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* through modulate p38 MAPK *in vivo* and *in vitro* [J]. *FASEB J*, 2020, 34(1): 1783-1801.
- [18] Laine J E, Auriola S, Pasanen M, *et al.* Acetaminophen bioactivation by human cytochrome P450 enzymes and animal microsomes [J]. *Xenobiotica*, 2009, 39(1): 11-21.
- [19] Lala V, Zubair M, Minter D A. *Liver function tests* [M]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.
- [20] McGill M R. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers [J]. *EXCLI J*, 2016, 15: 817-828.
- [21] McGill M R, Jaeschke H. Metabolism and disposition of acetaminophen: Recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis [J]. *Pharm Res*, 2013, 30(9): 2174-2187.
- [22] Du K, Ramachandran A, Jaeschke H. Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential [J]. *Redox Biol*, 2016, 10: 148-156.
- [23] Yan M Z, Huo Y Z, Yin S T, *et al.* Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions [J]. *Redox Biol*, 2018, 17: 274-283.
- [24] Sies H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine [J]. *Redox Biol*, 2015, 4: 180-183.
- [25] Albano E, Vidali M. Immune mechanisms in alcoholic liver disease [J]. *Genes Nutr*, 2010, 5(2): 141-147.
- [26] García-Román R, Francés R. Acetaminophen-induced liver damage in hepatic steatosis [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2020, 107(5): 1068-1081.
- [27] Sakamoto T, Imai H. Hydrogen peroxide produced by superoxide dismutase SOD-2 activates sperm in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(36): 14804-14813.
- [28] Wang P, Jia J D, Zhang D. Purinergic signalling in liver diseases: Pathological functions and therapeutic opportunities [J]. *JHEP Rep*, 2020, 2(6): 100165.
- [29] Weinberg S E, Sena L A, Chandel N S. Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity [J]. *Immunity*, 2015, 42(3): 406-417.
- [30] Pearce E L, Poffenberger M C, Chang C H, *et al.* Fueling immunity: Insights into metabolism and lymphocyte function [J]. *Science*, 2013, 342(6155): 1242454.
- [31] Rafiei H, Omidian K, Bandy B. Dietary polyphenols protect against oleic acid-induced steatosis in an *in vitro* model of NAFLD by modulating lipid metabolism and improving mitochondrial function [J]. *Nutrients*, 2019, 11(3): 541.
- [32] Seifert E L, Estey C, Xuan J Y, *et al.* Electron transport chain-dependent and-independent mechanisms of mitochondrial H₂O₂ emission during long-chain fatty acid oxidation [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(8): 5748-5758.
- [33] Dröse S, Stepanova A, Galkin A. Ischemic A/D transition of mitochondrial complex I and its role in ROS generation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1857(7): 946-957.
- [34] Ramachandran A, Visschers R G J, Duan L Q, *et al.* Mitochondrial dysfunction as a mechanism of drug-induced hepatotoxicity: Current understanding and future perspectives [J]. *J Clin Transl Res*, 2018, 4(1): 75-100.
- [35] Win S, Than T A, Min R W M, *et al.* C-Jun N-terminal kinase mediates mouse liver injury through a novel Sab (SH₃BP5)-dependent pathway leading to inactivation of intramitochondrial Src [J]. *Hepatology*, 2016, 63(6): 1987-2003.
- [36] Peng X W, Yang Y Q, Tang L, *et al.* Therapeutic benefits of apocynin in mice with lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury via suppression of the late stage pro-apoptotic AMPK/JNK pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 110020.
- [37] Gunawan B K, Liu Z X, Han D, *et al.* C-Jun N-terminal kinase plays a major role in murine acetaminophen hepatotoxicity [J]. *Gastroenterology*, 2006, 131(1): 165-178.
- [38] Kim B J, Ryu S W, Song B J. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(30): 21256-21265.
- [39] Wang W, Wen D, Duan W, *et al.* Systemic administration of scAAV9-IGF1 extends survival in SOD1G93A ALS mice via inhibiting p38 MAPK and the JNK-mediated apoptosis pathway [J]. *Brain Res Bull*, 2018, 139: 203-210.
- [40] 石明亮, 王晓磊, 李江琳, 等. 基于 Wnt 信号通路研究表没食子酸儿茶素没食子酸酯对肝星状细胞活化的作用及机制 [J]. *中草药*, 2022, 53(3): 758-766.

[责任编辑 李亚楠]