

蓬莪术醋制前后改善斑马鱼急性肝损伤的作用机制研究

林丽婷¹, 王继森^{2#}, 高天慧¹, 朱宗萍¹, 罗益蓉¹, 卿莹¹, 郭亭君¹, 陈元惠¹, 廖婉^{1*}

1. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

2. 成都市药品检验研究院, 国家药品监督管理局中药材质量监测评价重点实验室, 四川 成都 610045

摘要: 目的 基于核因子E2相关因子2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)/Smad3 信号通路探讨醋制前后蓬莪术改善硫代乙酰胺 (thioacetamide, TAA) 诱导斑马鱼急性肝损伤的作用机制。方法 以醋制前后的蓬莪术为研究对象, 建立 TAA 诱导斑马鱼急性肝损伤模型, 将醋制前后蓬莪术水煎液分别设置高、中、低剂量 (8、4、2 mg/mL) 组, 以异甘草酸镁为阳性对照药物组, 斑马鱼培养水为对照组, 给药 72 h 后观察斑马鱼幼鱼肝脏形态, 通过苏木素-伊红 (HE) 染色观察肝组织病理变化; 采用试剂盒检测斑马鱼幼鱼中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活性及谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平; 利用 qRT-PCR 检测斑马鱼幼鱼 *Nrf2*、白细胞介素-10 (interleukin-10, *IL-10*)、*Smad3* 和 *Smad7* 基因表达; Western blotting 测定斑马鱼幼鱼 Nrf2/HO-1 和 TGF- β /Smad3 信号通路相关蛋白表达。结果 醋制前后蓬莪术对 TAA 导致的肝组织细胞形态损伤具有保护作用。生化结果表明, 与模型组比较, 醋制前后蓬莪术水煎液组 ALT、AST 活性及 GSH 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), MDA 水平均显著降低 ($P < 0.001$)。qRT-PCR 结果表明, 与模型组比较, 醋制前后蓬莪术水煎液组 *Nrf2*、*IL-10*、*Smad7* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 醋蓬莪术水煎液高剂量组 *Smad3* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.001$); 其中, 与等剂量蓬莪术组相比, 醋蓬莪术高剂量组显著抑制 *Nrf2*、*Smad3* 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$ 、 0.001), 且醋蓬莪术具有促进 *IL-10* 和 *Smad7* mRNA 表达的趋势, 但没有显著性差异。Western blotting 结果表明, 与模型组比较, 蓬莪术水煎液高、中剂量组和醋蓬莪术水煎液各剂量组 Nrf2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$), 蓬莪术高剂量组和醋蓬莪术各剂量组 Smad3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 蓬莪术水煎液高剂量组和醋蓬莪术水煎液高、中剂量组 TGF- β 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 其中, 与等剂量蓬莪术组相比, 醋蓬莪术各剂量组 Nrf2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$), 且醋蓬莪术具有抑制 Smad3 和 TGF- β 蛋白表达的趋势, 但没有显著性差异。结论 醋制前后的蓬莪术可以不同程度地改善 TAA 诱发的急性肝损伤, 其作用机制可能与调控 Nrf2/HO-1 和 TGF- β /Smad3 信号通路有关。

关键词: 蓬莪术; 急性肝损伤; 核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶-1 通路; 转化生长因子- β /Smad3 信号通路; 姜黄素; 呋喃二烯

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)08-2611-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.08.012

Mechanism of raw and vinegar-processed *Curcuma phaeocaulis* on improving acute liver injury in zebrafish

LIN Liting¹, WANG Jisen², GAO Tianhui¹, ZHU Zongping¹, LUO Yirong¹, QING Ying¹, GUO Tingjun¹, CHEN Yuanhui¹, LIAO Wan¹

1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Key Laboratory of Quality Monitoring and Evaluation of Chinese Medicinal Materials, National Medical Products Administration, Chengdu Institute for Drug Control, Chengdu 610045, China

收稿日期: 2023-11-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82274099); 四川省自然科学基金面上项目 (24NSFSC1101); 成都市科技局国合项目 (2022-GH02-00033-HZ)

作者简介: 林丽婷, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂新技术、新剂型和炮制研究。Tel: 15928086785 E-mail: 1069590640@qq.com

#共同第一作者: 王继森, 男, 副主任药师, 硕士, 从事药品检验研究工作。E-mail: 93230623@qq.com

*通信作者: 廖婉, 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药炮制工艺与机制、中药制剂研究。E-mail: liaowan@cdutcm.edu.cn

Abstract: Objective To investigate the mechanism of raw and vinegar-processed *Curcuma phaeocaulis* on improving thioacetamide (TAA)-induced acute liver injury in zebrafish based on nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) and transforming growth factor- β (TGF- β)/Smad3 signaling pathway. **Methods** The raw and vinegar-processed *C. phaeocaulis* were studied and the TAA-induced acute liver injury model of zebrafish was established. High-, medium- and low-doses (8, 4, 2 mg/mL) of raw and vinegar-processed *C. phaeocaulis* water decoction were set. Magnesium isoglycyrrhizinate was used as positive control group, and zebrafish culture water was used as normal control group. The liver morphology of zebrafish larvae was observed 72 h after administration, and the pathological changes of liver tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) activities and glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) levels in zebrafish larvae were detected by kit; qRT-PCR was used to detect *Nrf2*, interleukin-10 (*IL-10*), *Smad3* and *Smad7* gene expressions in zebrafish larvae; Western blotting was used to determine the expressions of Nrf2/HO-1 and TGF- β /Smad3 signaling pathway related proteins in zebrafish larvae. **Results** Raw and vinegar-processed *C. phaeocaulis* water decoction had protective effect on the morphological injury of liver cells caused by TAA. Biochemical results showed that compared with model group, ALT, AST activities and GSH level in raw and vinegar-processed *C. phaeocaulis* water decoction group were significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), MDA level was significantly decreased ($P < 0.001$). The results of qRT-PCR showed that compared with model group, the mRNA expression levels of *Nrf2*, *IL-10* and *Smad7* in raw and vinegar-processed *C. phaeocaulis* group water decoction were significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), while the mRNA expression levels of *Smad3* in vinegar-processed *C. phaeocaulis* group were significantly decreased ($P < 0.001$). Compared with the same dose of *C. phaeocaulis* group, vinegar-processed *C. phaeocaulis* high-dose group significantly inhibited the mRNA expression of *Nrf2* and *Smad3* ($P < 0.05, 0.001$), and the vinegar-processed *C. phaeocaulis* showed a tendency to promote *IL-10* and *Smad7* mRNA expression, but there was no significant difference. Western blotting results showed that compared with model group, the expression level of Nrf2 protein in the high-dose and medium-dose groups of *C. phaeocaulis* and the dosage groups of vinegar-processed *C. phaeocaulis* were significantly increased ($P < 0.001$). The expression level of Smad3 protein in high-dose *C. phaeocaulis* and the dosage groups of vinegar-processed *C. phaeocaulis* was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The expression level of TGF- β protein in high-dose *C. phaeocaulis* and high-, medium-dose groups of vinegar-processed *C. phaeocaulis* was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Among them, the Nrf2 protein level of the dosage groups of vinegar-processed *C. phaeocaulis* was significantly higher than that of the same dose of *C. phaeocaulis* group ($P < 0.001$), and vinegar-processed *C. phaeocaulis* showed a tendency to inhibit the expression of Smad3 and TGF- β , but there was no significant difference. **Conclusion** The raw and vinegar-processed *C. phaeocaulis* can improve TAA-induced acute liver injury to varying degrees, and the mechanism of action may be related to the regulation of Nrf2/HO-1 and TGF- β /Smad3 signaling pathways.

Key words: *Curcuma phaeocaulis* Val.; acute liver injury; nuclear factor-erythroid 2-related factor 2/heme oxygenase-1 pathway; transforming growth factor- β /Smad3 signaling pathway; curcumin; furanodiene

蓬莪术是《中国药典》2020年版中莪术的主要来源之一，为姜科植物 *Curcuma phaeocaulis* Val. 的干燥根茎^[1]。蓬莪术性温，味辛、苦，归肝、脾经，具有行气破血、消积止痛的功效，被誉为“破血消癥要药”。中医临床上常用于治疗癥痕痞块、瘀血经闭。现代药理学研究表明，蓬莪术具有抗肝炎、抗肿瘤、抗氧化等药理作用^[2]。蓬莪术醋制品也为中医临床的常用药物，清《本经逢原》载：“莪术，入肝经药醋炒”^[3-4]。醋制后蓬莪术主入肝经血分，能增强散瘀止痛的作用。课题组前期发现蓬莪术能通过影响肝组织转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)/Smads 通路延缓肝病进程，醋制后对刀豆球蛋白 A 所致小鼠肝损伤的保护作用比生品强^[5]。醋制后蓬莪术能够更好地调控 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/髓样分化因

子 88 (myeloid differentiation primary response protein 88, MyD88)/核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路而发挥抗炎作用，进而改善肝损伤症状^[6]。

急性肝损伤 (acute liver injury, ALI) 是指短时间内由多种原因如自身免疫、酒精、病毒及化学物质等原因引发肝细胞受损的一种疾病，以细胞坏死、炎症和氧化损伤为特征，严重情况下可迅速发展成危及生命的急性肝衰竭 (acute liver failure, ALF)^[7]。硫代乙酰胺 (thioacetamide, TAA) 是一种经典的肝脏有毒化合物，可通过引发氧化应激和炎症反应导致器官受损，被广泛应用于构建肝损伤实验模型^[8]。研究表明，TAA 可导致斑马鱼的 ALI，具有与哺乳动物模型相似的病理特征，存在着脂肪变性-纤维化-凋亡的过程^[9]。因此，本研究采用模式生物斑马鱼，建立 TAA 诱导的 ALI 模型，探究醋制前后蓬莪术水

煎液对肝损伤的保护作用, 基于核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2) / 血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 信号通路和 TGF- β /Smad3 信号通路探讨醋制前后蓬莪术水煎液对肝损伤的改善作用机制, 为蓬莪术在临床上防治 ALI 提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

AB 系野生型斑马鱼, 购自国家斑马鱼资源中心, 于成都中医药大学西南特色中药资源国家重点实验室斑马鱼实验平台饲养。在 28 °C、光照 14 h/黑暗 10 h 的环境下, 将成熟的健康雌性和雄性 AB 系野生型斑马鱼分别放养, 每天喂 2 次丰年虾。实验前 1 晚, 将健康的 AB 斑马鱼成鱼, 按雌雄 1:2 的比例放入底部有筛网的交配缸内, 用透明隔板隔开, 次日清晨移除隔板, 产卵 1 h 内观察产卵量并收集鱼卵。

1.2 药材

蓬莪术饮片 (批号 1903041) 购自四川成都荷花池中药材专业市场, 经成都中医药大学裴瑾教授鉴定为姜科植物蓬莪术 *C. phaeocaulis* Val. 的干燥根茎。醋蓬莪术饮片采用课题组前期专利方法进行炮制 (专利号 ZL201310400255.2): 取蓬莪术饮片, 按 10:3 的比例加入 9° 米醋, 搅拌均匀后闷润 2 h, 煮干醋液后, 于 120 °C 干燥 30 min, 取出放凉, 干燥即得。

1.3 药品与试剂

二甲苯 (批号 2022051901)、无水乙醇 (批号 2022070501) 购自成都市科隆化学品有限公司; 苏木素-伊红 (HE) 染液套装 (批号 DH0020) 购自 Leagene 公司; 中性树胶 (批号 10004160) 购自国药集团化学试剂有限公司; 丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 试剂盒 (批号 140122005)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 试剂盒 (批号 140222005) 购自 Mindray 公司; 谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 试剂盒 (批号 AK06HXZ06586)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 AK038P4L0488) 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; Animal Total RNA Isolation Kit (批号 RE-03014) 购自成都福际生物技术有限公司; SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (批号 G2003-50T) 购自武汉赛维尔生物技术有限公司; β -actin 抗体 (批号 AF7018) 购自美国 Affinity 公司; Nrf2 抗体 (批号 YT3189) 购自美国 ImmunoWay 公司; Smad3 抗体

(批号 ET1607-41)、TGF- β 抗体 (批号 HA721143) 购自成都华江生物科技有限公司; HRP 标记的山羊抗兔二抗 (批号 70-GAR0072)、HRP 标记的山羊抗小鼠二抗 (批号 70-GAM0072) 购自杭州联科生物科技股份有限公司; 异甘草酸镁注射液 (批号 20211101204) 购自南京正大天晴制药有限公司。

1.4 仪器

HM325 型切片机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Stepone plus 型荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); SLAN-96S 型全自动医用 PCR 分析系统 (上海宏石医疗科技有限公司); D3024 型台式高速微量离心机、D3024R 型台式高速冷冻离心机 (美国赛洛捷克 SCILOGEX 公司); ChemiScope 6100 型化学发光成像系统 (上海勤翔科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 醋制前后蓬莪术水煎液的制备

取蓬莪术、醋蓬莪术饮片, 分别加 15 倍量去离子水, 浸泡 30 min, 煎煮 2 次, 每次 30 min, 趁热滤过, 合并 2 次水煎液, 50 °C 减压浓缩, 即得醋制前后蓬莪术水煎液。根据《中国药典》2020 年版含量测定的方法, 经高效液相色谱仪分别测定, 蓬莪术水煎液中姜黄素的质量浓度为 1.366 mg/mL, 呋喃二烯的质量浓度为 0.024 mg/mL; 醋蓬莪术水煎液中姜黄素的质量浓度为 11.907 mg/mL, 呋喃二烯的质量浓度为 0.018 mg/mL。

2.2 动物分组、造模与给药

在斑马鱼发育至受精后 72 h (72 h post fertilization, 72 hpf), 挑选发育正常的斑马鱼幼鱼, 随机分为对照组、模型组、异甘草酸镁 (5 mg/mL) 组及蓬莪术水煎液高、中、低剂量 (8、4、2 mg/mL) 组和醋蓬莪术水煎液高、中、低剂量 (8、4、2 mg/mL) 组。移入 12 孔板的样孔中, 每孔 10 条幼鱼, 每组设置 3 个复孔。对照组加入 2 mL 斑马鱼培养水, 模型组加入 2 mL TAA (8 mmol/L), 各给药组加入 1 mL TAA (8 mmol/L) 和 1 mL 相应药物, 连续 3 d 于同一时刻给药, 初次给药体积为 2 mL, 此后每天换液一半, 以保持药量和水质的新鲜。

2.3 斑马鱼肝脏表型观察

给药后 72 h (72 h post exposure, 72 hpe), 收集各组斑马鱼幼鱼, 首先使用三卡因麻醉 3 min, 然后固定于羧甲基纤维素钠 (carboxymethylcellulose sodium, CMC-Na) 中。调整斑马鱼姿势为侧卧位, 在体式显微镜下采集图像, 观察斑马鱼肝脏表型。

2.4 HE 染色法观察肝脏病理情况

斑马鱼幼鱼的新鲜组织经多聚甲醛固定 24 h 后, 进行脱水、包埋, 制作 3 μm 石蜡切片, HE 染色后在光学显微镜下观察肝脏组织结构, 随机选取视野进行拍照记录。

2.5 斑马鱼幼鱼中 ALT、AST 活性及 GSH、MDA 水平的测定

取斑马鱼幼鱼, 提取蛋白, 用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度, 按照试剂盒说明书测定 ALT、AST 活性及 GSH、MDA 水平。

2.6 qRT-PCR 法测定斑马鱼幼鱼中 *Nrf2*、白细胞介素-10 (*interleukin-10*, *IL-10*)、*Smad3*、*Smad7* mRNA 表达

取斑马鱼幼鱼, 提取总 RNA, 用逆转录试剂盒合成 cDNA, 将反应得到的 cDNA 作为模板进行目的基因扩增。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 10 min, 循环 1 次, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火延伸 30 s, 循环 40 次。使用 PCR 仪自带软件进行荧光定量分析, 依据 Ct 值计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 以 β -actin 为内参基因计算 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	正向序列	反向序列
<i>Nrf2</i>	5'-TGCCCCTGTGGTCAAAGTG-3'	5'-GGTTCGGTTACCGTCCTGC-3'
<i>IL-10</i>	5'-CCGAACAGCCAACGAATCC-3'	5'-ACATCCTCCATCCTTCACAGA-3'
<i>Smad3</i>	5'-TGGACGACTACAGCCATTC-3'	5'-CGTCCATGCTGTGGTTCATC-3'
<i>Smad7</i>	5'-CAGATTCCCAACTTCTTCTG-3'	5'-GTTGAAGATGACCTCCAGCC-3'
β -actin	5'-ATAGCACAGCCTGGATAGCAACGTAC-3'	5'-CACCTTCTACAATGAGCTGCGTGTG-3'

2.7 Western blotting 测定斑马鱼幼鱼中 *Nrf2*、*Smad3* 和 TGF- β 蛋白表达

取斑马鱼幼鱼, 提取总蛋白, 使用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。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, 加入 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 分别加入一抗, 4 °C 孵育过夜, 洗膜 3 次, 每次 5 min, 加入二抗, 室温孵育 1 h, 洗膜 3 次, 每次 5 min。采用 ECL 化学发光成像系统采集图像, 用凝胶成像仪自带分析软件分析条带灰度值。

2.8 统计学分析

使用 SPSS 22.0 统计软件分析结果, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。若符合正态分布, 组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验; 若不符合正态分布采用非参数检验。利用 Graphpad prism 9.3.0 软件制作柱状图。

3 结果

3.1 斑马鱼肝脏表型观察结果

如图 1 所示, 异甘草酸镁组斑马鱼肝脏形状均匀, 颜色为浅黄褐色; 模型组斑马鱼肝脏外观呈褐色, 外观粗糙。醋制前后蓬莪术水煎液治疗可缓解上述病理特征。视觉观察结果显示, 醋制前后蓬莪术水煎液各给药组之间没有显著的差异。

3.2 斑马鱼肝组织 HE 染色结果

如图 2 所示, 对照组斑马鱼整体结构未见明显



图 1 斑马鱼肝脏表型图 (×100)

Fig. 1 Representative photograph of liver phenotype in zebrafish (× 100)

异常, 肝脏肝细胞核清晰, 胞质较丰富, 排列较规则。模型组斑马鱼肝脏出现少量的空泡变性, 细胞质中呈现大小不一的圆形空泡, 大量肝细胞胞质疏松。与模型组比较, 醋制前后蓬莪术水煎液治疗后上述病理损伤均明显减轻。说明醋制前后蓬莪术水煎液对 TAA 导致的肝组织细胞形态损伤具有保护作用。

3.3 蓬莪术醋制前后对 TAA 诱导的斑马鱼幼鱼中 ALT、AST 活性及 GSH、MDA 水平的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组斑马鱼幼鱼中 ALT、AST 活性及 GSH 水平显著降低 ($P < 0.001$), MDA 水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 醋制前后蓬莪术水煎液组 ALT、AST 活性及

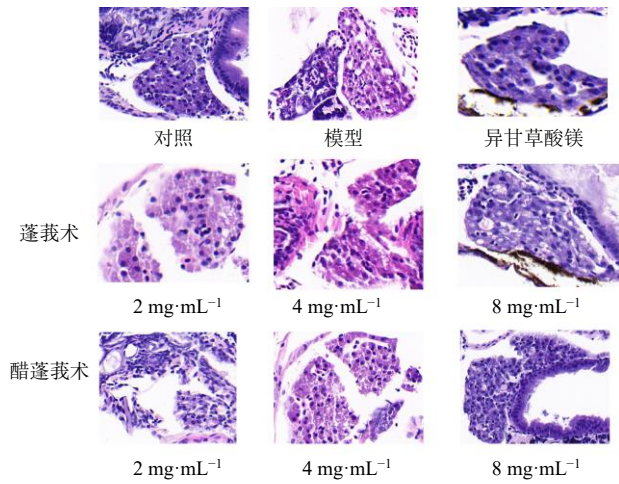
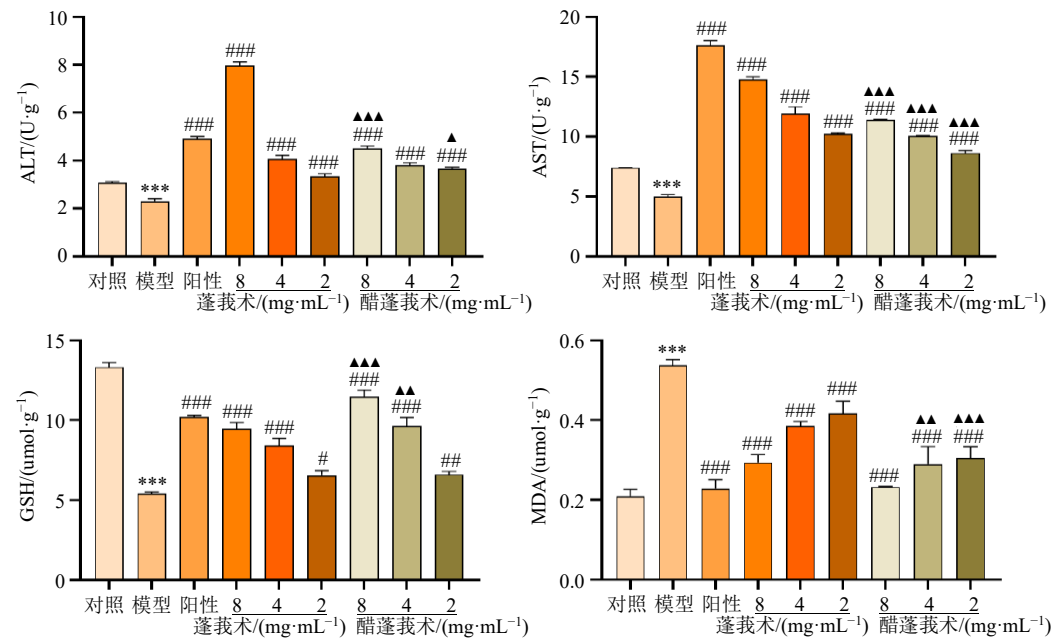


图2 斑马鱼肝组织 HE 染色结果 (×400)

Fig. 2 HE staining result of liver tissue of zebrafish (×400)



阳性-异甘草酸镁: 与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与蓬莪术相同剂量组比较: ^ $P < 0.05$ ^^ $P < 0.01$ ^^ $P < 0.001$, 下同。

Positive-magnesium isoglycyrrhizinate: *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group; ^ $P < 0.05$ ^^ $P < 0.01$ ^^ $P < 0.001$ vs *C. phaeocaulis* group with same dose, same as below figures.

图3 蓬莪术醋制前后对 TAA 诱导的斑马鱼幼鱼中 ALT、AST 活性及 GSH、MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of raw and vinegar-processed *C. phaeocaulis* on ALT, AST activities and GSH, MDA levels in TAA-induced zebrafish larvae ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

0.001); 与模型组比较, 醋制前后蓬莪术水煎液高、中剂量组 *Nrf2*、*IL-10* mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 蓬莪术水煎液高、中剂量组和醋蓬莪术水煎液高剂量组 *Smad7* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 醋蓬莪术水煎液高剂量组 *Smad3* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.001$)。其中, 与等剂量蓬莪术组相比, 醋蓬

GSH 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), MDA 水平显著降低 ($P < 0.001$)。其中, 与等剂量蓬莪术水煎液组相比, 醋蓬莪术水煎液高剂量组 ALT 活性显著降低 ($P < 0.001$), 醋蓬莪术水煎液各剂量组 AST 活性显著降低 ($P < 0.001$), 醋蓬莪术水煎液高、中剂量组 GSH 水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), 醋蓬莪术水煎液中、低剂量组 MDA 水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。表明蓬莪术醋制后能更好地通过缓解氧化应激达到改善 TAA 诱导肝损伤的目的。

3.4 蓬莪术醋制前后对 TAA 诱导的斑马鱼幼鱼中 *Nrf2*、*IL-10*、*Smad3*、*Smad7* mRNA 表达的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组斑马鱼幼鱼中 *Nrf2*、*IL-10*、*Smad7* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.001$), *Smad3* mRNA 表达水平显著升高 ($P <$

我术水煎液高剂量组显著抑制 *Nrf2*、*Smad3* 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$ 、 0.001), 且醋蓬莪术水煎液具有促进 *IL-10* 和 *Smad7* mRNA 表达的趋势, 但没有显著性差异。

3.5 蓬莪术醋制前后对 TAA 诱导的斑马鱼幼鱼中 *Nrf2*、*Smad3*、TGF- β 蛋白表达的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组斑马鱼幼

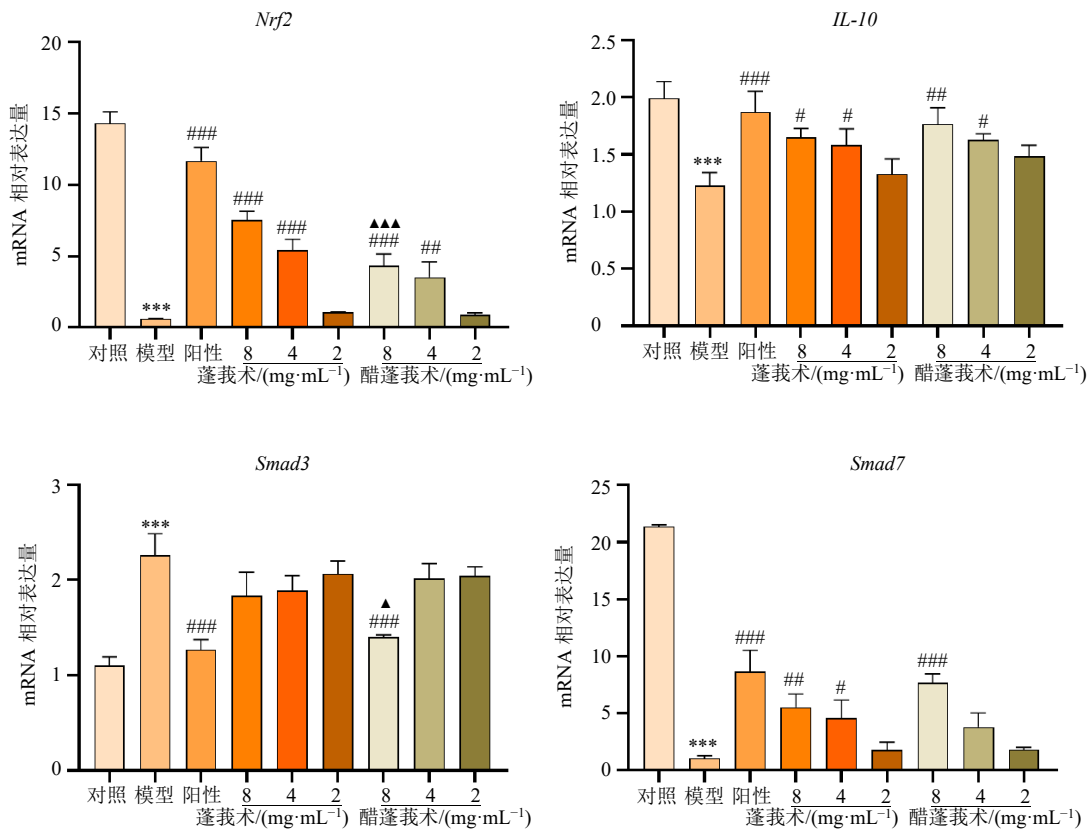


图4 蓬莪术醋制前后对 TAA 诱导的斑马鱼幼鱼中 *Nrf2*、*IL-10*、*Smad3*、*Smad7* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Fig. 4 Effects of raw and vinegar-processed *C. phaeocaulis* on *Nrf2*, *IL-10*, *Smad3* and *Smad7* mRNA expressions in TAA-induced zebrafish larvae ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

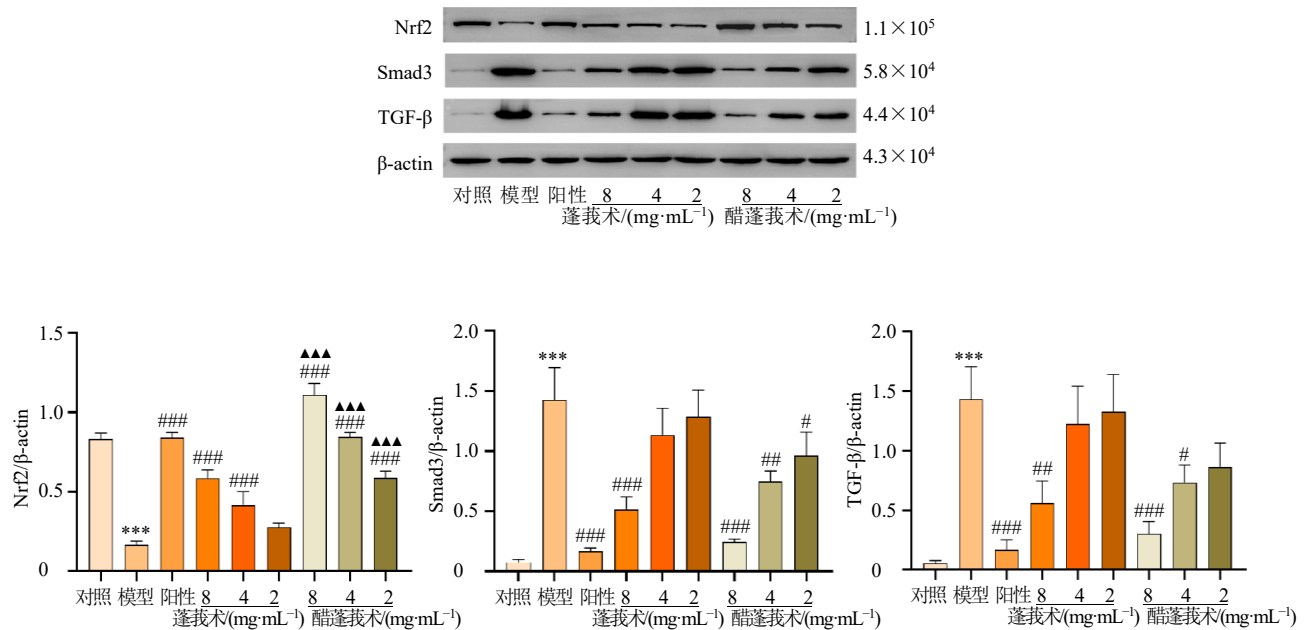


图5 蓬莪术醋制前后对 TAA 诱导的斑马鱼幼鱼中 *Nrf2*、*Smad3*、*TGF-β* 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Fig. 5 Effects of raw and vinegar-processed *C. phaeocaulis* on *Nrf2*, *Smad3* and *TGF-β* protein expressions in TAA-induced zebrafish larvae ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

鱼中 Smad3 和 TGF- β 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$), Nrf2 蛋白水平显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 蓬莪术水煎液高、中剂量组和醋蓬莪术水煎液各剂量组 Nrf2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$), 蓬莪术水煎液高剂量组和醋蓬莪术水煎液各剂量组 Smad3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 蓬莪术水煎液高剂量组和醋蓬莪术水煎液高、中剂量组 TGF- β 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。其中, 与等剂量蓬莪术水煎液组相比, 醋蓬莪术各剂量组 Nrf2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$), 且醋蓬莪术具有抑制 Smad3 和 TGF- β 蛋白表达的趋势, 但没有显著性差异。结果表明, 醋制前后蓬莪术水煎液可通过调节 Nrf2/HO-1 信号通路和 TGF- β /Smad3 信号通路对 TAA 诱导的斑马鱼急性肝损伤发挥潜在的保护作用。

4 讨论

斑马鱼作为一种新兴模式生物, 具有多种独特的优势, 在药理学和毒理学研究中应用广泛。斑马鱼具有发育周期短、繁殖能力强、高通量化和快速筛选等特点, 遗传学分析表明斑马鱼的基因组与人类超过 87% 的同源性, 其基因信号传导通路和代谢通路也与人类高度保守性^[10]。此外, 斑马鱼肝脏有许多和哺乳动物类似的反应, 如对外源化学物质的防御机制相当, 以及脂类和糖原储存。斑马鱼幼鱼通体透明, 可以直接活体观察其器官的发育和功能。因此相对于其他模式动物, 斑马鱼在建立肝损伤模型方面具备较为显著的优势^[9]。周楚莹等^[11]采用二乙基亚硝胺构建斑马鱼药物性肝纤维化模型, 发现牛大力水提物对药物性肝纤维化损伤的保护作用是通过抑制肝细胞凋亡、减少胶原纤维沉积实现的。崔佳琦等^[12]通过构建斑马鱼兴奋期醉酒模型、醉酒模型及酒精性肝损伤模型, 结果表明各剂量茯苓-葛根-枳椇子混合药粉均有不同程度的预防醉酒作用、解酒作用及肝损伤保护作用。孟瑞媛等^[10]通过构建黄曲霉毒素 B₁ 诱导的斑马鱼肝损伤模型, 结果表明姜黄素通过调节与脂肪合成、抗氧化和能量代谢相关的通路, 起到了修复肝损伤的作用。课题组前期采用 flk1-EGFP 转基因斑马鱼研究姜黄抗血管生成的作用^[13]。因此, 本研究采用了新型模式斑马鱼探究蓬莪术醋制前后对肝损伤的缓解作用。

ALT 和 AST 是反映肝损伤的标志性酶, ALT 主要位于肝细胞细胞质中, AST 在肝细胞线粒体中含量最高, 常用于肝脏疾病的诊断^[14]。本研究中, TAA

诱导的斑马鱼幼鱼肝损伤后, 模型组 ALT 和 AST 活性均显著低于对照组。在 TAA 引起肝损伤后, 肝细胞合成 ALT 和 AST 的能力降低^[15]。从整个动物模型的角度来看, 斑马鱼幼鱼的 ALT 和 AST 活性也降低了, 因此组织匀浆中 ALT 和 AST 的总活性可能会降低。GSH 是平衡氧化与抗氧化中重要的抗氧化酶, 可以清除细胞内氧自由基, 反映机体抗氧化能力; MDA 是膜脂过氧化最重要的产物之一, 可以提示机体内过量产生活性氧的程度^[16]。本研究中, 醋制前后的蓬莪术治疗后, GSH 水平均不同程度的升高, MDA 水平均不同程度的降低, 呈剂量相关性。表明抑制氧化应激可能是醋制前后蓬莪术改善斑马鱼幼鱼肝损伤的途径之一。

氧化应激和炎症反应在介导急性肝损伤的发生和发展过程中有至关重要的作用, 抑制氧化应激和炎症被认为是治疗肝损伤的重要策略^[17]。Nrf2 是一种内源性调控因子, 被活性氧和抗氧化剂等多种元素激活后进入细胞核, 与抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 结合, 进而调节体内多种抗氧化酶的表达, 发挥抗氧化功能。HO-1 是 Nrf2 信号的下游靶基因, 能够通过降解亚铁血红素生成一氧化氮等产物参与氧化应激损伤等病理生理过程, Nrf2/HO-1 通路对机体抵抗氧化应激损伤具有积极的正向作用^[18]。qRT-PCR 和 Western blotting 结果显示, 与对照组比较, 模型组 Nrf2 mRNA 和蛋白表达量减少可能是由于在 TAA 诱导氧化损伤情况下, 肝细胞需要持续地合成足够的 Nrf2 去应对氧化应激, 而肝脏的损伤使 Nrf2 合成不足, 从而出现了 Nrf2 mRNA 和蛋白表达量减少的情况。与模型组比较, 醋制前后蓬莪术水煎液组 Nrf2 mRNA 和蛋白表达量升高, 表明醋制前后蓬莪术水煎液组可能通过促进 Nrf2 的合成来提高其基础水平, 从而减轻 TAA 诱导的肝脏损伤, 并逐渐降低机体的氧化应激水平, 使其恢复正常。

TGF- β 具有特定的自分泌和旁分泌作用, 能介导白细胞群体内炎症细胞的活化、迁移和增殖的调节, 是调节组织炎症和修复的重要细胞因子^[19]。Smad3 是一种膜受体激活的 Smad, 参与 TGF- β /活化素信号途径。许多研究已经证实, TGF- β /Smads 信号传导途径是 TGF- β 发挥生物学作用的主要机制。TGF- β 的异常表达不仅促进肝癌细胞的增殖、迁移, 而且与病毒性肝炎、肝功能衰竭以及其他慢性肝病等多种肝脏疾病相关^[20]。qRT-PCR 和 Western

blotting 结果显示,与模型组比较,醋制前后蓬莪术水煎液能显著下调 *Smad3* mRNA 表达水平,降低 *Smad3* 和 TGF- β 的蛋白表达量,提示醋制前后蓬莪术水煎液可抑制 TGF- β 表达,降低激活的 *Smad* 的表达,抑制肝细胞内 TGF- β /*Smads* 信号通路,从而发挥对 ALI 的保护作用。

课题组前期采用质谱法发现蓬莪术醋制前后的主要差异成分是没食子酸、阿魏酸、莪术醇、常春藤素^[21]。研究发现没食子酸对于肝脏损伤具有保护作用,其机制可能与增强抗氧化损伤能力、降低炎症因子水平有关^[22]。阿魏酸糖酯能够激活 Nrf2 抗氧化信号通路,促进 Nrf2/Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) -ARE 抗氧化信号通路下游相关抗氧化酶的表达,从而有效保护大鼠免受 AAPH 诱导的氧化损伤^[23]。莪术醇可以下调 TGF- β 1 和 *Smad2/3* 蛋白和基因的表达,从而阻止 TGF- β 1/*Smad* 信号通路的活动达到抗肝纤维化的作用^[24]。常春藤素对肝脏损伤有显著的抑制效果,还能减少肝脏氧化应激,同时对小鼠的体质量也有明显的抑制作用^[25]。这些差异性的成分可能是蓬莪术醋制前后药效变化的物质基础,将进一步研究这些单体成分对斑马鱼肝损伤的保护作用。

本研究基于 Nrf2/HO-1 信号通路和 TGF- β /*Smad3* 信号通路探究醋制前后蓬莪术水煎液对 TAA 诱导 ALI 斑马鱼的保护作用机制。结果表明,醋制前后蓬莪术水煎液均可改善 TAA 诱导的 ALI 斑马鱼幼鱼的一般生理状态及肝脏损伤程度,调控 Nrf2/HO-1 信号通路和 TGF- β /*Smad3* 信号通路,改善肝脏氧化应激和炎症反应发挥作用。研究发现与蓬莪术相比,醋蓬莪术调节 TGF- β /*Smad3* 信号通路水平更具有降低的趋势,说明蓬莪术醋制后抗炎的效果更好。本研究初步阐明蓬莪术“醋制入肝”的炮制机制,为蓬莪术的临床应用提供实验依据,同时为蓬莪术防治 ALI 提供了理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 13, 286.
- [2] 高天慧, 廖婉, 傅超美, 等. 基于 pH 值动态变化的川产道地药材蓬莪术醋制前后化学成分差异研究 [J]. 中草药, 2017, 48(24): 5174-5178.
- [3] 清·张璐. 本经逢原 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1996: 157.
- [4] Liao W, Chen Y, Zhu Z P, et al. Vinegar-processed *Curcuma phaeocaulis* promotes anti-angiogenic activity and reduces toxicity in zebrafish and rat models [J]. *Pharm Biol*, 2021, 59(1): 410-417.
- [5] 汪蕾. 川产道地药材蓬莪术醋制前后“成分—吸收—药效”差异性研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.
- [6] Gao T H, Liao W, Lin L T, et al. *Curcuma Rhizoma* and its major constituents against hepatobiliary disease: Pharmacotherapeutic properties and potential clinical applications [J]. *Phytomedicine*, 2022, 102: 154090.
- [7] 唐浪, 宋添力, 吴广阳, 等. 土家药竹节参多糖通过 Nrf2-ARE 信号通路对四氯化碳致大鼠急性肝损伤的抗氧化保护作用 [J]. 中草药, 2023, 54(15): 4866-4873.
- [8] 宋磊. 伊赫汤及姜黄素对硫代乙酰胺诱导的斑马鱼幼鱼肝纤维化的抑制作用 [D]. 通辽: 内蒙古民族大学, 2023.
- [9] 齐玉娟, 张靖溥. 硫代乙酰胺诱导的斑马鱼急性肝损伤模型 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(5): 782-789.
- [10] 孟瑞媛, 卯明彩, 宋晓, 等. 姜黄素对黄曲霉毒素 B₁ 诱导的斑马鱼肝损伤的修复作用 [J]. 农产品质量与安全, 2023(2): 33-39.
- [11] 周楚莹, 赖裕玲, 谢凌鹏, 等. 牛大力水提物对斑马鱼药物性肝纤维化损伤的保护作用 [J]. 新中医, 2018, 50(12): 12-16.
- [12] 崔佳琦, 彭桂英, 冯昊天, 等. 茯苓-葛根-枳椇子混合药粉对斑马鱼解酒保肝作用研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2022, 36(6): 24-28.
- [13] 朱宗萍, 王继森, 廖婉, 等. 基于模式生物斑马鱼研究姜黄抗血管新生的作用及机制 [J]. 中草药, 2021, 52(11): 3257-3268.
- [14] 姜昊, 袁佳, 史海涛, 等. 血清 ALT、AST 联合 NFS 评分对非酒精性脂肪性肝硬化患者食管胃底静脉曲张严重程度的评估价值 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2020, 30(4): 314-317.
- [15] Choi J E, Kim S, Ahn J H, et al. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish [J]. *Aquat Toxicol*, 2010, 100(2): 151-159.
- [16] Karakoç M D, Sekkin S. Effects of oleuropein on epirubicin and cyclophosphamide combination treatment in rats [J]. *Turk J Pharm Sci*, 2021, 18(4): 420-429.
- [17] Farzanegi P, Dana A, Ebrahimpoor Z, et al. Mechanisms of beneficial effects of exercise training on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): Roles of oxidative stress and inflammation [J]. *Eur J Sport Sci*, 2019, 19(7): 994-1003.
- [18] 张霖. 活化 Nrf2 上调 HO-1 表达抑制 C57 小鼠深静脉血栓形成的研究 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2019.

- [19] 叶蕾, 余亚平, 陈芝芸, 等. 补肾化痰方对肝纤维化大鼠肝组织 TGF β 1/Smad3 表达的影响 [J]. 浙江中医杂志, 2018, 53(12): 869-870.
- [20] van Rijn R, Schurink I J, de Vries Y, *et al.* Hypothermic machine perfusion in liver transplantation—A randomized trial [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(15): 1391-1401.
- [21] Gao T H, Lin L T, Yang Q S, *et al.* The raw and vinegar-processed *Curcuma phaeocaulis* Val. ameliorate TAA-induced zebrafish liver injury by inhibiting TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(2): 117246.
- [22] 吕云龙, 殷强, 罗沿源, 等. 赶黄草活性成分槲皮素和没食子酸对 CCl₄所致小鼠急性肝损伤的保护作用及机制 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2022, 32(4): 352-356.
- [23] 夏雪芬, 董施彬, 李翠, 等. 阿魏酸糖酯对氧化损伤的保护作用机制研究进展 [J]. 中国科技信息, 2021(7): 93.
- [24] 郑洋, 卢能源, 黄永贤, 等. 基于 TGF- β 1/Smad 信号通路探讨莪术醇对肝纤维化小鼠作用的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(11): 149-152.
- [25] 金春美. 五种天然活性成分抗弓形虫作用的研究 [D]. 延吉: 延边大学, 2021.

[责任编辑 李亚楠]