

槲皮素对黄药子致肝损伤小鼠的保护作用及其机制

王欣¹, 张雨涵¹, 史磊磊¹, 上官惠子¹, 宋佳莲¹, 安宇宇¹, 谢允东^{1*}, 刘继平^{1,2,3}

1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046

2. 陕西省食品药品安全监测重点实验室, 陕西 咸阳 712046

3. 陕西省中医药管理局 中药药效机制与物质基础重点实验室, 陕西 咸阳 712046

摘要: **目的** 探究槲皮素对黄药子致肝损伤的保护作用及其机制。**方法** 将48只昆明小鼠随机分为对照组、模型组、水飞蓟宾(100 mg/kg)组和槲皮素高、中、低剂量(80、50、20 mg/kg)组。对照组ig 0.5%羧甲基纤维素钠溶液, 其余各组小鼠ig相应药物及黄药子醇提物(2 g/kg), 1次/d, 连续30 d。实验结束后称定小鼠体质量和肝脏质量, 计算肝脏指数; 测定血浆中天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性及丙二醛(malonaldehyde, MDA)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、IL-1 β 水平; 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色观察肝脏组织病理学变化; TUNEL染色法检测肝脏细胞凋亡情况; 采用Western blotting检测肝脏核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、磷酸化核因子- κ B p65(phosphorylated nuclear factor- κ B p65, p-NF- κ B p65)、血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)、B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、多药耐药相关蛋白2(multidrug resistance-associated protein 2, MRP2)、尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶1A1(uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1, Ugt1a1)、P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)表达; 采用qRT-PCR检测肝脏MRP2、P-gp、Ugt1a1的mRNA表达。**结果** 与模型组比较, 槲皮素显著降低小鼠肝脏指数及肝功能($P < 0.05$ 、 0.01), 减轻肝脏组织病理变化, 降低血浆中MDA水平($P < 0.05$ 、 0.01), 升高SOD活性($P < 0.01$), 降低TNF- α 、IL-1 β 水平($P < 0.05$ 、 0.01), 升高IL-10水平($P < 0.01$), 抑制肝脏p-NF- κ B p65、Bax蛋白表达($P < 0.05$ 、 0.01), 促进Nrf2、HO-1及药物转运体蛋白表达($P < 0.05$ 、 0.01), 并上调MRP2、P-gp、Ugt1a1的mRNA表达($P < 0.01$)。**结论** 槲皮素对黄药子诱导的肝损伤有一定保护作用, 其作用机制可能与减轻炎症、抑制细胞凋亡、调控Nrf2及药物转运体的表达相关。

关键词: 槲皮素; 黄药子; 肝损伤; 炎症; 凋亡; 核因子E2相关因子2; 药物转运体

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)10-3345-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.10.013

Protective effect and mechanism of quercetin on mice with liver injury induced by *Dioscorea bulbifera*

WANG Xin¹, ZHANG Yuhan¹, SHI Leilei¹, SHANGGUAN Huizi¹, SONG Jialian¹, AN Yuyu¹, XIE Yundong¹, LIU Jiping^{1,2,3}

1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

2. Shaanxi Key Laboratory for Safety Monitoring of Food and Drug, Xianyang 712046, China

3. Key Laboratory of Pharmacodynamic Mechanism and Material Basis of Chinese Medicine of Shaanxi Administration of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect and mechanism of quercetin against *Dioscorea bulbifera* (DB)-induced liver injury. **Methods** A total of 48 KM mice were randomly divided into control group, model group, silybin (100 mg/kg) group, and quercetin high-, medium-, low-dose (80, 50, 20 mg/kg) groups. Mice in control group was ig 0.5% CMC-Na solution. The remaining groups were administered with drug and ethanol extract (2 g/kg) of DB, once a day for 30 d. After the experiment, the body weight and

收稿日期: 2023-12-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82204790)

作者简介: 王欣, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药神经药理学。E-mail: Wangxin200012@163.com

*通信作者: 谢允东, 男, 博士, 副教授, 研究方向为中药物质质量及安全性评价。E-mail: eng522@126.com

liver weight were measured and liver index was calculated; Activities of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), superoxide dismutase (SOD), and levels of malonaldehyde (MDA), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-10 (IL-10), IL-1 β in plasma were detected; Pathological changes in liver were observed by hematoxylin-eosin staining (HE); Apoptosis of liver cells was detected using TUNEL staining; Western blotting was used to determine protein expressions of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), phosphorylated nuclear factor- κ B p65 (p-NF- κ B p65), heme oxygenase-1 (HO-1), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2), uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1 (Ugt1a1) and P-glycoprotein (P-gp) in liver; qRT-PCR was used to detect mRNA expressions of *MRP2*, *P-gp* and *Ugt1a1* in liver. **Results** Compared with model group, quercetin significantly reduced liver index and liver function ($P < 0.05, 0.01$), reduced pathological change in liver tissue, reduced MDA level in plasma ($P < 0.05, 0.01$), increased SOD activity ($P < 0.01$), reduced levels of TNF- α , IL-1 β ($P < 0.05, 0.01$), increased IL-10 level ($P < 0.01$), inhibited p-NF- κ B p65 and Bax protein expressions in liver ($P < 0.05, 0.01$), promoted Nrf2, HO-1 and drug transporter protein expressions ($P < 0.05, 0.01$), and up-regulated the mRNA expressions of *MRP2*, *P-gp* and *Ugt1a1* ($P < 0.01$). **Conclusion** Quercetin has a certain protective effect on DB-induced liver injury, and its mechanism may be related to reducing inflammation, inhibiting cell apoptosis, regulating the expression of Nrf2 and drug transporters. **Key words:** quercetin; *Dioscorea bulbifera* L.; liver injury; inflammation; apoptosis; nuclear factor erythroid 2-related factor 2; drug transporter

黄药子最早记载于唐代《千金月令》，为薯蓣科植物多年生草质缠绕藤本黄独 *Dioscorea bulbifera* L.的干燥块茎，味苦，性寒，有小毒，入肺、肝经，可凉血、降火、消癭、解毒^[1]。黄药子临床常用于治疗多种癌症、炎症反应、甲状腺肿大等，其疗效确凿、临床使用价值颇高。随着黄药子临床应用的增加，其不良反应也逐渐显现，限制了其临床应用及疗效发挥。黄药子及其复方制剂所致不良反应包括肝损伤、肾毒性和胃肠道不适等，其中肝损伤最为严重^[2-3]。临床表现为胃纳减退、乏力、上腹部饱胀、恶心及肝脾肿大和黄疸等，严重者会出现肝衰竭甚至死亡^[4]。黄药子致肝损伤主要是由二萜内酯类化合物在肝脏蓄积诱发氧化应激反应导致^[5]。核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)是一种重要的核转录因子，可调节抗氧化蛋白的表达，减轻炎症及氧化应激，防止肝损伤^[6]。Nrf2的激活是药物转运体发挥肝保护作用的重要机制。药物转运体是细胞膜上一类用于转运药物的蛋白，影响药物在肝脏中的吸收、分布、代谢和排泄，在大多数情况下，这些转运蛋白能促进药物和相应代谢物进出细胞^[7]。黄药子可通过抑制药物转运体，增加二萜内酯类化合物及其代谢物在肝脏组织的蓄积，进而导致肝损伤的发生^[8]。寻找有效的药物缓解其肝损伤对扩大其临床应用具有重要意义。

槲皮素为植物衍生的黄酮类化合物，广泛存在于山豆根、黄芩、槐花等中药中，其抗氧化、抗炎、抗癌作用尤为突出^[9-11]。近年来，有研究显示槲皮素具有保肝活性，可减轻药物性肝损伤^[12-13]。其肝保

护作用可能与激活 Nrf2-抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)通路、抑制核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路，进而增强下游抗氧化基因的表达、抑制炎症因子释放密切相关^[14]。研究显示，槲皮素可通过上调多药耐药蛋白3(multi-drug resistance 3, MDR3)、有机阴离子转运多肽、多药耐药相关蛋白2(multidrug resistance-associated protein2, MRP2)表达改善胆汁淤积幼鼠肝功能，减轻肝组织病理变化^[15]。本研究首次探究了槲皮素对黄药子致肝损伤小鼠的肝保护作用，并基于抗炎、抗氧化及对药物转运体的调节作用探讨槲皮素改善黄药子致肝损伤的作用机制，为槲皮素作为护肝药物的药理学机制研究和增加黄药子临床应用提供理论参考。

1 材料

1.1 动物

SPF级昆明小鼠，体质量(20±2)g，购自成都达硕实验动物有限公司，实验动物许可证号SCXK(川)2020-030。动物饲养于陕西中医药大学中药药理实验室，室温(23±3)℃，饲养动物期间给予正常饮水饮食。动物实验经陕西中医药大学伦理委员会批准(批准号SUCMDL20220304009)。

1.2 药品与试剂

黄药子(批号20220901)购自陕西兴盛德药业有限责任公司，经陕西中医药大学颜永刚教授鉴定为薯蓣科植物黄独 *D. bulbifera* L.的干燥块茎；槲皮素(质量分数>97%，批号BNU332)购自上海毕得医药科技股份有限公司；水飞蓟宾(质量分数>

98%，批号 2020030301）购自盘锦天源药业有限公司；天冬氨酸氨基转移酶（aspartate aminotransferase, AST）试剂盒（批号 20230320）、丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotransferase, ALT）试剂盒（批号 20230314）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）试剂盒（批号 20230313）和丙二醛（malonaldehyde, MDA）试剂盒（批号 20230315）均购自南京建成生物工程研究所；小鼠肿瘤坏死因子- α （tumor necrosis factor- α , TNF- α ）、白细胞介素-10（interleukin-10, IL-10）、IL-1 β 试剂盒（批号 03/2023）均购自上海源桔生物科技有限公司；BCA 蛋白浓度测定试剂盒（批号 WLA004）、Nrf2 抗体（批号 R04112135）、血红素加氧酶-1（heme oxygenase-1, HO-1）抗体（批号 R04262400）、NF- κ B p65 抗体（批号 R03281273）、磷酸化 NF- κ B p65（p-NF- κ B p65）抗体（批号 R03281273）、核因子- κ B 抑制因子 α （inhibitor of NF- κ B- α , I κ B α ）抗体（批号 R01041936）、B 淋巴细胞瘤-2（B-cell lymphoma-2, Bcl-2）抗体（批号 R04221556）、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 associated X protein, Bax）抗体（批号 R0411673）、P-糖蛋白（P-glycoprotein, P-gp）抗体（批号 N12272395）、 β -actin 抗体（批号 R04251372）、Histone H3（批号 R01040984）、HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗（批号 15A033）购自沈阳万类生物科技有限公司；MRP2 抗体（批号 386C9A09）购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶 1A1（uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1, Ugt1a1）抗体（批号 6100001286）购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.3 仪器

BSA224S 型分析电子天平[赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]；UPHW-II-90T 型纯水仪（成都超纯科技有限公司）；1-15K 型低温高速离心机（美国 Sigma 公司）；酶标仪（美国 Bio-Tek 公司）；JT-12S 型组织自动脱水机、JB-L5 型石蜡包埋机（武汉俊杰电子有限公司）；电泳仪（北京六一科技有限公司）。

2 方法

2.1 黄药子醇提物（ethanol extract of *D. bulbifera*, EEDB）的制备

取黄药子打碎成粗粉浸泡 30 min 后，加入 6 倍量 75%乙醇加热回流提取 3 次，每次 2 h，合并提取液于旋转蒸发器蒸干至粉末状，-20 °C 保存，经

HPLC 测定 EEDB 中黄独素 B 质量分数为 0.18%。

2.2 动物分组、造模及给药

动物适应性喂养 3 d 后，将 48 只小鼠随机分为对照组、模型组、水飞蓟宾（100 mg/kg）组和槲皮素高、中、低剂量（80、50、20 mg/kg）组，每组 8 只。对照组 ig 等体积 0.5%羧甲基纤维素钠溶液，其余各组小鼠 ig 相应药物及 EEDB（2 g/kg），1 次/d，连续 30 d。

2.3 肝脏指数的测定

末次给药 24 h 后称定小鼠体质量，解剖后称取小鼠肝脏质量，计算肝脏指数。

肝脏指数 = 肝湿质量/体质量

2.4 血浆生化指标检测

末次给药后，各组小鼠禁食不禁水 24 h，眼球取血后置于抗凝离心管中，4 °C、3 000 r/min 离心 15 min，取上层血浆，置于-80 °C 冰箱备用。按照试剂盒说明书测定血浆中 AST、ALT、SOD 活性及 MDA、IL-1 β 、IL-10、TNF- α 水平。

2.5 肝组织病理学观察

用生理盐水冲洗肝脏组织表面后将其置入 4%多聚甲醛固定液中，石蜡包埋后进行切片，脱蜡后进行苏木素-伊红（HE）染色，在显微镜下观察肝组织病理变化。

2.6 TUNEL 染色检测肝组织细胞凋亡情况

按照试剂盒说明书操作，肝脏组织切片经脱蜡脱水后，采用蛋白酶 K 处理，通过 DAB 显色来显示凋亡细胞，苏木素复染并烘干后封片，使用光学显微镜观察凋亡细胞并拍照。

2.7 Western blotting 检测肝脏组织相关蛋白表达

取各组小鼠肝脏组织，将混合的裂解液加入样品中，4 °C、12 000 r/min 离心 10 min，收集上清液，经 BCA 试剂盒测定蛋白含量，加入上样缓冲液混合，100 °C 加热 15 min 使蛋白变性。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，于 5%脱脂牛奶中封闭后，加入一抗 4 °C 孵育过夜，TBST 洗膜 3 次后，加入二抗室温孵育 1 h，TBST 洗膜 3 次后，采用 ECL 底物发光系统显像，然后扫描胶片并保存图像，采用 Image J 软件分析目标条带灰度值。

2.8 qRT-PCR 检测肝脏组织药物转运体表达

采用 Trizol 法提取肝脏组织中总 RNA，按照反转录试剂盒提供的说明进行 cDNA 合成，然后使用 Exicycler™ 96 荧光定量试剂盒进行 qRT-PCR 分析。

MRP2、P-gp、Ugt1a1 引物序列见表 1，肝组织中 mRNA 的表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
MRP2	F: ATCAAGAGCACCGAGAA R: GTCCAATGGAGGCAATA
P-gp	F: TACGCCTACTATTACACCG R: CCAGCCTATCTCCTGATT
Ugt1a1	F: TTCTCCGTACCTTCTGT R: AGTCCGTCCAAGTTCCA
β -actin	F: CTGTGCCATCTACGAGGGCTAT R: TTTGATGTCACGCACGATTCC

2.9 统计学分析

使用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计分析，数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，若符合正态分布，组间比较采用单因素方差分析；若不符合正态分布采用非参数检验。利用 Graphpad prism 软件制作柱状图。

3 结果

3.1 槲皮素对黄药子致肝损伤小鼠体质量、肝脏指数及肝功能的影响

如图 1 所示，实验期间，每周记录小鼠体质量，

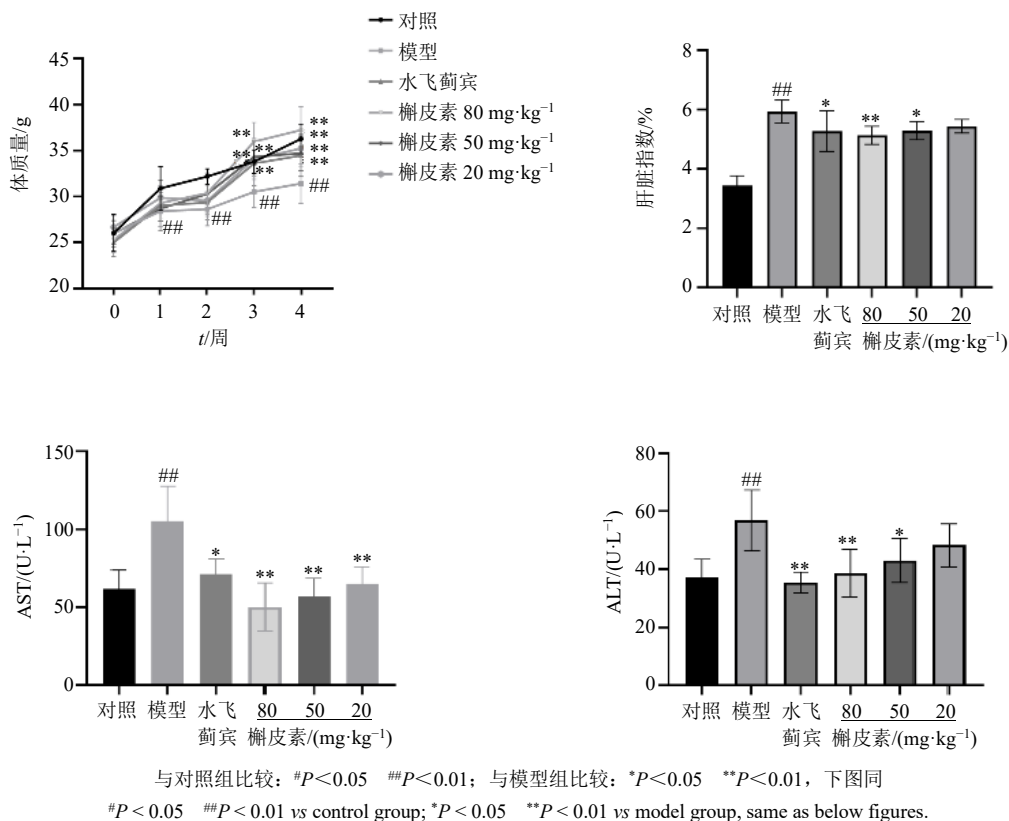


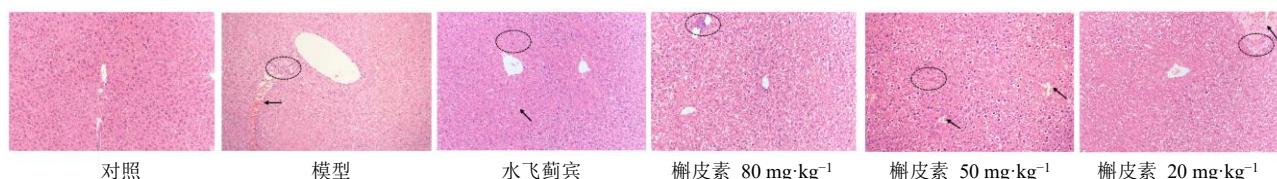
图 1 槲皮素对黄药子醇提取物致肝损伤小鼠体质量、肝脏指数及肝功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effect of quercetin on body weight, liver index and liver function in mice with liver injury induced by EEDB ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

实验第 1 周，与对照组比较，模型组体质量显著下降 ($P < 0.01$)；实验第 3、4 周，与模型组比较，槲皮素各剂量组体质量显著升高 ($P < 0.01$)。实验结束后测定肝脏指数及血浆生化指标，与对照组比较，模型组小鼠肝脏指数显著升高 ($P < 0.01$)，血浆中 AST、ALT 活性显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，水飞蓟宾组、槲皮素中、高剂量组小鼠肝脏指数及 ALT 活性均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)，水飞蓟宾组和槲皮素各剂量组血浆 AST 活性均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)，提示槲皮素对黄药子致肝损伤小鼠的肝功能有明显改善作用。

3.2 槲皮素对黄药子致肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响

如图 2 所示，对照组小鼠肝组织细胞形态正结构正常，排列整齐，无炎性细胞浸润；模型组小鼠肝组织可见细胞坏并伴有炎症细胞浸润；与模型组比较，水飞蓟宾及槲皮素各剂量组给药后可明显改善肝细胞形态结构，可不同程度地减轻肝脏细胞坏死及炎症细胞浸润现象，提示槲皮素对黄药子致肝损伤小鼠的肝组织细胞损伤具有保护作用。



箭头表示炎性浸润，虚线表示细胞坏死。

Arrow indicates inflammatory infiltration, and dashed line indicates cell necrosis.

图2 槲皮素对黄药子醇提物致肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 2 Effect of quercetin on pathological changes of liver in mice with liver injury induced by EEDB (HE, × 200)

3.3 槲皮素对黄药子致肝损伤小鼠氧化应激的影响

如表2所示，与对照组比较，模型组小鼠血浆SOD活性显著降低 ($P < 0.01$)，MDA水平显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组小鼠血浆SOD活性显著升高 ($P < 0.001$)，MDA水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)，提示槲皮素可抑制黄药子致肝损伤小鼠的氧化应激。

3.4 槲皮素对黄药子致肝损伤小鼠血浆炎症水平的影响

如表3所示，与对照组比较，模型组小鼠血浆IL-10水平显著降低 ($P < 0.01$)，TNF- α 及IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，水飞蓟宾组及槲皮素高、中剂量组小鼠血浆IL-10水平显著升高 ($P < 0.01$)，IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05$)，

表2 槲皮素对黄药子醇提物致肝损伤小鼠氧化应激的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of quercetin on oxidative stress in mice with liver injury induced by EEDB ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(mmol·mL ⁻¹)
对照	—	47.71 ± 5.61	4.28 ± 0.96
模型	—	29.28 ± 5.26 ^{##}	6.65 ± 1.29 ^{##}
水飞蓟宾	100	40.48 ± 5.43 ^{**}	5.29 ± 0.81 ^{**}
槲皮素	80	54.65 ± 5.76 ^{**}	3.77 ± 1.11 ^{**}
	50	48.61 ± 5.53 ^{**}	4.67 ± 1.13 ^{**}
	20	45.75 ± 6.29 ^{**}	5.22 ± 0.99 [*]

与对照组比较：^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较：^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ，下表同。

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below tables.

表3 槲皮素对黄药子醇提物致肝损伤小鼠炎症水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of quercetin on levels of inflammation in mice with liver injury induced by EEDB ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-10/(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	332.68 ± 23.30	75.48 ± 9.86	531.32 ± 42.09
模型	—	268.46 ± 19.43 ^{##}	100.22 ± 9.31 ^{##}	734.75 ± 34.83 ^{##}
水飞蓟宾	100	306.61 ± 24.97 ^{**}	89.32 ± 7.33 [*]	656.24 ± 41.08 ^{**}
槲皮素	80	324.96 ± 22.71 ^{**}	84.73 ± 11.75 [*]	568.65 ± 48.32 ^{**}
	50	308.41 ± 29.26 ^{**}	87.87 ± 7.93 [*]	612.05 ± 45.30 ^{**}
	20	283.79 ± 27.70	91.36 ± 8.90	664.75 ± 31.81 ^{**}

槲皮素各剂量组TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.01$)，提示槲皮素可黄药子致肝损伤小鼠炎症反应。

3.5 槲皮素对黄药子致肝损伤小鼠肝细胞凋亡的影响

如图3所示，与对照组比较，模型组明显观察到肝细胞凋亡；与模型组比较，各给药肝细胞凋亡均有所减少。如图4所示，与对照组比较，模型组小鼠肝脏Bax蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)，Bcl-2蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组

比较，水飞蓟宾及槲皮素高剂量组Bax蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)，水飞蓟宾及槲皮素高、中剂量组Bcl-2蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)，提示槲皮素对黄药子致肝损伤小鼠的肝细胞凋亡具有保护作用。

3.6 槲皮素对黄药子致肝损伤小鼠肝脏炎症相关蛋白及Nrf2、HO-1、MRP2、P-gp、Ugt1a1蛋白表达的影响

如图5所示，与对照组比较，模型组小鼠肝脏

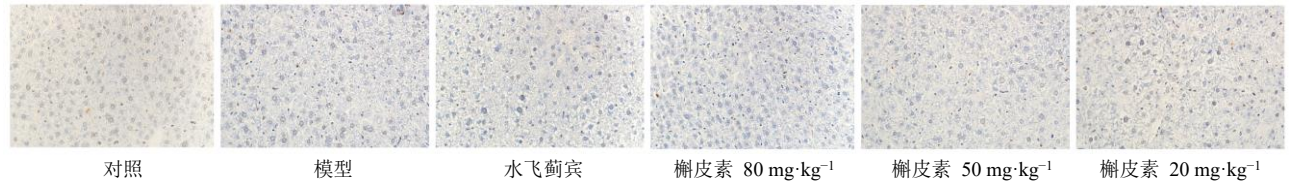
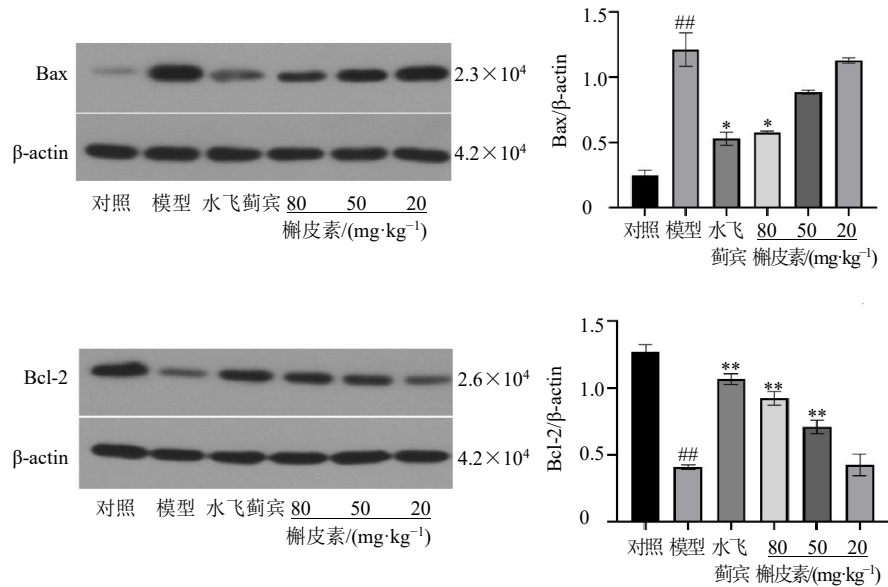


图3 槲皮素对黄药子醇提取物致肝损伤小鼠肝细胞凋亡的影响 (×400)

Fig. 3 Effect of quercetin on hepatocyte apoptosis in mice with liver injury induced by EEDB (×400)



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下图同。

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图4 槲皮素对黄药子醇提取物致肝损伤小鼠肝组织凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of quercetin on apoptosis-related protein expressions in mice with liver injury induced by EEDB ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

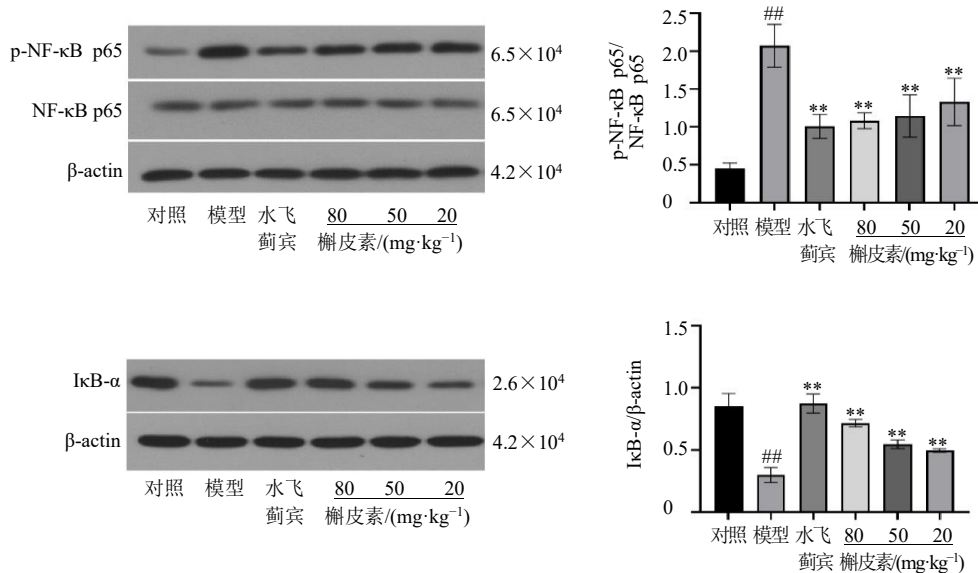


图5 槲皮素对黄药子醇提取物致肝损伤小鼠肝脏炎症相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of quercetin on inflammation-related protein expressions in liver of mice with liver injury induced by EEDB ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

p-NF-κB p65 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), IκB-α 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组 p-NF-κB p65 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), IκB-α 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。

如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝脏 Nrf2、HO-1、MRP2、P-gp、Ugt1a1 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01); 与模型组比较, 水飞蓟宾及槲皮素高剂量组 Nrf2、P-gp、Ugt1a1 蛋白表

达水平均显著升高 ($P < 0.01$), 水飞蓟宾及槲皮素高、中剂量组 HO-1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), 槲皮素高剂量组 MRP2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 提示槲皮素可通过 Nrf2/NF-κB 信号通路改善黄药子致小鼠肝损伤。

3.7 槲皮素对黄药子致肝损伤小鼠肝脏 MRP2、P-gp、Ugt1a1 基因表达的影响

如表 4 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝脏 MRP2、P-gp、Ugt1a1 mRNA 表达水平均显著降低

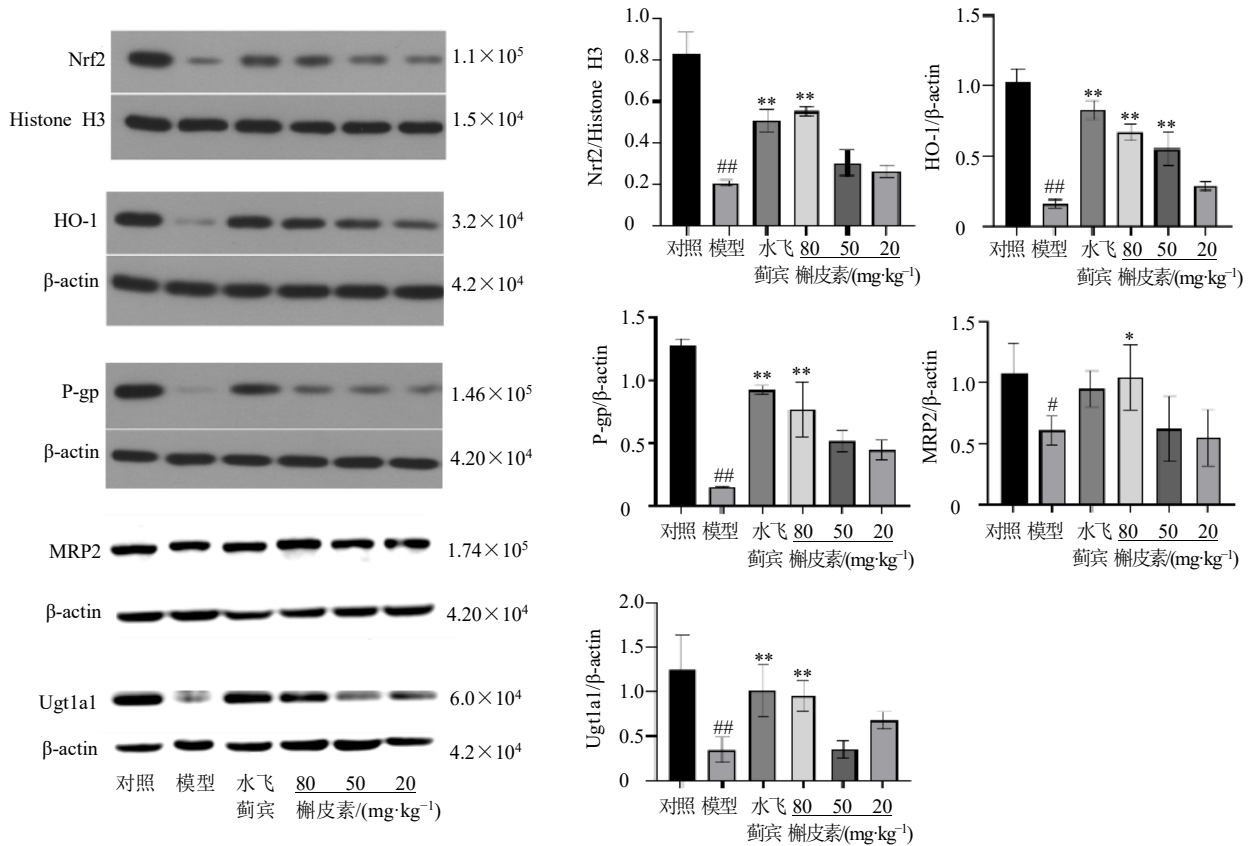


图 6 槲皮素对黄药子醇提取物致肝损伤小鼠肝脏 Nrf2、HO-1、MRP2、P-gp、Ugt1a1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of quercetin on Nrf2, HO-1, MRP2, P-gp and Ugt1a1 protein expressions in liver of mice with liver injury induced by EEDB ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 4 槲皮素对黄药子醇提取物致肝损伤小鼠肝脏药物转运体 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of quercetin on mRNA expressions of drug transporters in liver of mice with liver injury induced by EEDB ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量		
		MRP2	P-gp	Ugt1a1
对照	—	1.01 ± 0.12	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.08
模型	—	0.29 ± 0.01 ^{##}	0.34 ± 0.01 ^{##}	0.36 ± 0.05 ^{##}
水飞蓟宾	100	0.85 ± 0.06 ^{**}	0.78 ± 0.04 ^{**}	0.79 ± 0.06 ^{**}
槲皮素	80	0.68 ± 0.13 ^{**}	0.64 ± 0.07 ^{**}	0.67 ± 0.07 ^{**}
	50	0.51 ± 0.06 ^{**}	0.60 ± 0.08 ^{**}	0.56 ± 0.04 ^{**}
	20	0.33 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.46 ± 0.99

($P < 0.01$)；与模型组比较，水飞蓟宾及槲皮素高、中剂量组小鼠肝脏 *MRP2*、*P-gp*、*Ugt1a1* mRNA 表达水平均明显升高 ($P < 0.01$)。

4 讨论

本研究发现黄药子可导致小鼠氧化应激加重、释放炎症因子、诱导细胞凋亡，且黄药子还可抑制药物转运体的表达，干扰细胞新陈代谢，导致肝损伤的发生；而槲皮素干预后，小鼠细胞核 Nrf2 表达上调，NF- κ B p65 磷酸化及 Bax 凋亡途径过程被抑制，提示槲皮素可通过调控 Nrf2、NF- κ B 及 Bcl-2 相关蛋白，减轻氧化应激、抑制炎症因子的表达及细胞凋亡，减轻黄药子诱导的小鼠肝损伤。且本研究结果首次证明了槲皮素可通过激活 Nrf2 及其下游药物转运对黄药子诱导的肝损伤产生治疗效果。ALT、AST 是评价肝功能损伤的重要生物标志物，当肝细胞受损时，ALT 和 AST 会大量释放到血液中，ALT 和 AST 活性显著升高^[16]。本研究结果显示，在连续 ig EEDB 后，小鼠血浆 ALT、AST 活性显著升高，在给予不同剂量槲皮素后，血浆中 ALT、AST 活性显著降低，肝脏组织学评估也进一步证明了槲皮素对黄药子致肝损伤小鼠具有保护作用。

氧化应激在肝损伤的发生过程中发挥了重要作用，当药物在机体内蓄积时可导致细胞内活性氧的过量释放并降低抗氧化能力，从而引起过氧化脂质的堆积，造成肝细胞氧化应激损伤^[17]。Nrf2 是一个关键的转录因子，可以调节抗氧化酶（如 HO-1、SOD）的表达，减轻氧化应激。SOD 是人体内重要的抗氧化酶，可抑制脂质过氧化；丙二醛是新陈代谢的最终产物，MDA 的水平可以反映细胞氧化损伤的程度^[18]。本研究结果显示，给予小鼠 EEDB 后，小鼠血浆中 MDA 水平增加，SOD 活性降低，提示黄药子可导致机体氧化应激的产生，而槲皮素干预后，显著降低了 MDA 水平，增加了 SOD 活性；Western blotting 结果显示，槲皮素可抑制 EEDB 诱导的 Nrf2/HO-1 蛋白表达的下降，提示槲皮素可通过减轻氧化损伤来改善黄药子引起的肝损伤。

NF- κ B 是一种与调节细胞炎症反应有关的重要转录因子。在生理条件下，NF- κ B 与细胞质中的 I κ B α 结合，在接受外部刺激后，I κ B 降解，NF- κ B 亚基 p65 释放，磷酸化并迁移至细胞核，激活 NF- κ B 通路。这一过程会诱导 TNF- α 、IL-6 和 γ 干扰素等炎症因子的表达，并引起炎症反应^[19]。而研究显示黄药子可诱导 I κ B 蛋白减少及 NF- κ B p65 的磷酸

化及入核，诱发炎症反应^[20]。本研究结果显示，在连续给予 EEDB 后，肝脏 I κ B 蛋白表达显著减少，细胞核中 p65 的表达显著增加。而槲皮素逆转了这些变化。此外，槲皮素还抑制了 EEDB 引起的血清 TNF- α 和 IL-1 β 水平的升高以及 IL-10 水平的降低，这些结果表明，槲皮素可通过抑制炎症相关蛋白表达减轻 EEDB 诱导的肝脏炎症。

黄药子诱发的肝损伤常伴随细胞凋亡的发生^[21]，细胞凋亡是一个受特定基因高度调控的过程，Bcl-2 和 Bax 是重要的凋亡蛋白，其中 Bcl-2 可抑制细胞凋亡，Bax 可促进细胞凋亡^[22]。在本研究中，观察到连续给予 EEDB 后会导致小鼠肝脏 Bcl-2 蛋白表达显著减少和 Bax 表达显著增加。然而，槲皮素逆转了这些变化，且 TUNEL 染色结果显示槲皮素缓解了 EEDB 在肝组织中诱导的细胞凋亡。上述结果表明，槲皮素可以通过调节 Bax 介导的细胞凋亡途径来防止黄药子引起的肝损伤。

Nrf2 除发挥抗氧化作用外，还可调节药物转运体的表达，促进毒物的外排，减少其在肝脏的蓄积。药物转运体是一类促进药物跨细胞膜转运的蛋白质，影响药物在肝脏中的吸收、分布、代谢和排泄^[23]。本研究发现，黄药子抑制了 Nrf2 的表达，下调了 *Ugt1a1*、*MRP2*、*P-gp* 的蛋白及 mRNA 的表达，导致肝细胞损伤，槲皮素高、中剂量组干预后可加速毒性物质的排出，减轻肝损伤。这些研究结果表明，槲皮素可通过增加 Nrf2 的表达和调节下游药物转运体来保护黄药子诱导的肝损伤。

综上，槲皮素对黄药子诱导的肝损伤有一定保护作用，其作用机制可能与其减轻炎症、抑制细胞凋亡、调控 Nrf2 及药物转运体的表达相关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张盼盼, 仵琼, 葛肖肖, 等. 黄药子毒性成分及其致毒机制研究进展 [J]. 现代中医药, 2023, 43(2): 8-12.
- [2] 元传旺, 咸建春. 黄药子、向天果、黑骨藤致肝损伤 3 例报告 [J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(12): 2780-2782.
- [3] 苏莉, 朱建华, 程利宝, 等. 亚急性黄药子中毒的实验病理学研究 [J]. 法医学杂志, 2003, 19(2): 81-83.
- [4] 朱大诚, 况东, 徐丽婷, 等. 黄药子药理作用及临床应用 [J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(1): 239-243.
- [5] 齐静. 黄药子水提物对小鼠肝脏毒性及其线粒体途径损伤机制的研究 [D]. 大连: 辽宁师范大学, 2017.
- [6] Sun X, Wang P, Yao L P, et al. Paeonol alleviated acute alcohol-induced liver injury via SIRT1/Nrf2/NF- κ B

- signaling pathway [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2018, 60: 110-117.
- [7] 葛修通, 赵佳慧, 李丽, 等. 中药对药物转运体的影响作用研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2023, 34(5): 1196-1199.
- [8] Qu X Y, Tao L N, Zhang S X, *et al.* The role of Ntcp, Oatp2, Bsep and Mrp2 in liver injury induced by *Dioscorea bulbifera* L. and *Diosbulbin B* in mice [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2017, 51: 16-22.
- [9] 翟芷淇, 付悦, 张馨月, 等. 槲皮素脂质体抑制小鼠肺组织炎症作用的研究 [J]. *药物评价研究*, 2023, 46(1): 50-55.
- [10] 李阳杰, 曹瑞梅, 毛雅君, 等. 槲皮素的结构修饰及生物活性研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(5): 1636-1653
- [11] 王叶情, 王宇红, 邹蔓姝, 等. 槲皮素及其糖苷衍生物抗抑郁作用及其机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(5): 1548-1557.
- [12] Wei C B, Tao K, Jiang R, *et al.* Quercetin protects mouse liver against triptolide-induced hepatic injury by restoring Th17/Treg balance through Tim-3 and TLR4-MyD88-NF- κ B pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 53: 73-82.
- [13] 覃萍, 张薇, 陈紫莹, 等. 槲皮素对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. *广东化工*, 2022, 49(12): 63-66.
- [14] 张红娜, 周玉法, 刘敬博, 等. 基于 NF- κ B 和 Nrf2 信号通路探讨槲皮素的护肝功效及其作用机理 [J]. *西北农业学报*, 2020, 29(1): 143-149.
- [15] 吕歆, 张香军, 尚俊梅, 等. 槲皮素通过 FXR 信号通路对胆汁淤积幼鼠的治疗作用及其对 MDR3、MRP2、OATP2 表达的调控研究 [J]. *吉林中医药*, 2021, 41(7): 924-929.
- [16] 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.
- [17] 段晓梦, 马心予, 白天宇, 等. 不同药对配伍对栀子引起的肝损伤的保护作用研究 [J]. *中南药学*, 2023, 21(11): 2901-2907.
- [18] Hu Y W, Li M C, Wang Y P, *et al.* Protective effect of hot-water and ethanol-aqueous extracts from *Anneslea fragrans* against acetaminophen-induced acute liver injury in mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2023, 179: 113973.
- [19] Hong H W, Lou S Y, Zheng F L, *et al.* Hydnocarpin D attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via MAPK/NF- κ B and Keap1/Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Phytomedicine*, 2022, 101: 154143.
- [20] 牛成伟, 季莉莉, 王峥涛. 半枝莲对黄药子肝毒性的保护作用及其机制 [J]. *药学报*, 2016, 51(3): 373-379.
- [21] 范金晶. 甘草配伍黄药子对肝脏组织中 Bcl-2、Bax 表达影响的实验研究 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2015.
- [22] 张磊, 李德印, 靳双星, 等. 维生素 C 在对乙酰氨基酚致小鼠急性肝脏损伤中的作用 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2023(16): 108-114.
- [23] Xu Y, Lu J, Guo Y, *et al.* Hypercholesterolemia reduces the expression and function of hepatic drug metabolizing enzymes and transporters in rats [J]. *Toxicol Lett*, 2022, 364: 1-11.

[责任编辑 李亚楠]