

• 药理与临床 •

基于 mTOR 信号通路研究黄芩苷对对乙酰氨基酚诱导肝损伤后肝修复作用

张娟, 孙武燕, 王春宝, 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** 探讨黄芩苷对对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 诱导的肝损伤后肝再生的作用及机制。**方法** C57BL/6 小鼠随机分成对照组、模型组和黄芩苷 (40、80 mg/kg) 组, 小鼠 ip APAP (300 mg/kg) 1 h 后 ig 黄芩苷, ip APAP 24 h 或 48 h 后检测血清中天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 活性; 通过苏木素-伊红 (HE) 染色法观察肝脏的病理变化; 采用 qRT-PCR 检测肝脏组织中肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 和表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) mRNA 表达; 通过 BeyoClick™ EdU 法检测肝脏组织细胞增殖情况; 通过免疫组化染色法观察肝脏组织中增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 阳性细胞数量; 通过 Western blotting 检测肝脏组织中 PCNA、细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)、p62、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain, LC3B)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (phosphorylated mammalian target of rapamycin, p-mTOR) 和 p-S6 蛋白的表达。给予 mTOR 抑制剂雷帕霉素后, 观察雷帕霉素对黄芩苷促进肝修复作用的影响。**结果** 黄芩苷可以显著减少 APAP 诱导的急性肝损伤小鼠的肝坏死面积 ($P < 0.05, 0.01$), 上调肝脏 HGF、EGF mRNA 表达和 PCNA、Cyclin D1、p62、p-S6、p-mTOR 蛋白表达 ($P < 0.05, 0.01$), 下调 LC3B 蛋白表达 ($P < 0.05, 0.01$), 从而激活 mTOR 信号通路, 促进 APAP 诱导的肝损伤后肝再生。此外, 黄芩苷对肝再生的促进作用在给予 mTOR 抑制剂雷帕霉素后减弱 ($P < 0.05$)。**结论** 黄芩苷能够通过激活 mTOR 信号通路, 促进肝细胞增殖, 并抑制其介导的自噬, 从而促进肝修复。

关键词: 对乙酰氨基酚; 黄芩苷; mTOR; 肝再生; 肝修复

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)13-4399-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.13.012

Effect of baicalin on liver repair after acetaminophen-induced liver injury based on mTOR signaling pathway

ZHANG Juan, SUN Wuyan, WANG Chunbao, BAI Qingyun

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

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of baicalin on liver regeneration after acetaminophen (APAP)-induced liver injury. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group and baicalin (40, 80 mg/kg) groups. After 1 h of ip APAP (300 mg/kg), mice were given baicalin, activities of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in serum were measured after 24 h or 48 h of ip APAP; The pathological changes of liver tissue was observed using hematoxylin eosin (HE) staining method; qRT-PCR was used to detect hepatocyte growth factor (HGF) and epidermal growth factor (EGF) mRNA expressions in liver tissue; BeyoClick™ EdU method was used to detect the cell proliferation in liver tissue; The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) positive cells in liver tissue was observed using immunohistochemistry staining method; The expressions of PCNA, Cyclin D1, p62, microtubule associated protein 1 light chain 3 (LC3B), phosphorylated mammalian target of rapamycin (p-mTOR) and p-S6 proteins in liver tissue were detected using Western blotting. After administering mTOR inhibitor rapamycin, the effect of rapamycin on the promotion of liver repair by baicalin was observed. **Results** Baicalin could significantly reduce the area of liver necrosis in APAP-induced acute liver injury mice ($P < 0.05, 0.01$), up-regulate HGF, EGF mRNA expressions

收稿日期: 2024-02-21

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: 张娟, 硕士研究生, 研究方向为临床药学。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

and PCNA, Cyclin D1, p62, p-S6 and p-mTOR protein expressions in liver tissue ($P < 0.05, 0.01$), down-regulate LC3B protein expression ($P < 0.05, 0.01$), thereby activating the mTOR signaling pathway and promoting liver regeneration after APAP-induced liver injury. In addition, the promoting effect of baicalin on liver regeneration was weakened after administration of mTOR inhibitor rapamycin ($P < 0.05$). **Conclusion** Baicalin can promote liver cell proliferation and inhibit its mediated autophagy by activating mTOR signaling pathway, thereby promoting liver repair.

Key words: acetaminophen; baicalin; mTOR; liver regeneration; liver repair

药物性肝损伤 (drug-induced liver injury, DILI) 是影响全球人群的严重临床药物不良反应之一^[1]。对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 是解热镇痛抗炎药, 但当过量使用 APAP 时可诱发 DILI^[2]。已有研究表明 APAP 诱导的肝损伤不是来自其本身, 而是由细胞色素 P450 2E1 (cytochrome P450 2E1, CYP2E1) 和 CYP1A2 氧化形成的有毒代谢物 *N*-乙酰对苯醌亚胺 (*N*-acetyl-*p*-benzoquinoneimine, NAPQI) 导致的^[3]。NAPQI 进一步与谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 结合, 在治疗剂量下对肝细胞无明显有害影响。而过量的 APAP 会使 GSH 耗竭, 导致 NAPQI 与许多蛋白质的半胱氨酸上的巯基形成共价连接, 从而改变这些蛋白质的功能并触发肝细胞坏死和肝损伤^[4]。临床上对 APAP 致肝损伤的解毒主要局限于 *N*-乙酰半胱氨酸 (*N*-acetylcysteine, NAC) 的应用^[5], 但其必须在肝损伤早期应用^[6]。然而, NAC 也有恶心、呕吐甚至休克等不良反应^[7]。目前对 APAP 肝毒性防治药物的研究几乎都集中在肝损伤的早期阶段^[8], 而对于肝损伤的晚期阶段却鲜有研究。由此可见, 寻找到高效、安全的拮抗 APAP 肝毒性的药物具有重要意义, 尤其是能够促进损伤后肝修复的药物更值得深入研究。

黄芩苷是从唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 干燥的根中提取的一种黄酮类化合物^[9], 具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗氧化等药理作用^[10-11]。已有研究表明黄芩苷可以减轻 APAP 诱导的早期肝损伤^[12-13], 但目前对其在肝损伤后的修复和再生研究较少^[14]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 是磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 家族中的丝氨酸蛋白激酶, 包含 10 种不同蛋白复合物的 70 个催化亚基, 称为 mTOR 复合物 1 和 2 (mTORC1、mTORC2)^[15], mTORC1 的激活导致 p70S6 激酶 (S6K) 和真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1 (eIF4E-binding protein 1, 4E-BP1) 的磷酸化, 并随后激活和磷酸化 S6K1^[16-18]。据报道, 阻断蛋白激酶 B (protein

kinase B, Akt) /mTOR 信号通路可降低细胞增殖, 诱导细胞凋亡和周期阻滞, 抑制增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 表达^[19]。因此, 本研究基于 mTOR 信号通路探讨黄芩苷在 APAP 诱导的肝损伤晚期肝修复中的作用及机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 体质量 20~22 g, 购自湖南斯莱克景达实验有限公司, 许可证号 SCXK 湘 2019-0004。动物饲养于温度 (22±2) °C、自动通风、明暗光照周期 12h/12h、相对湿度 50%~60% 的环境中, 自由进食饮水, 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。

1.2 药品与试剂

黄芩苷 (质量分数 ≥98.0%, 批号 B20570) 购自上海源叶生物科技有限公司; APAP (质量分数 ≥99.0%, 批号 103-90-2) 购自上海麦克林生化科技有限公司; mTOR 抑制剂雷帕霉素 (质量分数 ≥99.0%, 批号 53123-88-9) 购自上海奥默生物技术有限公司; β-actin (批号 18)、PCNA (批号 7)、周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 抗体 (批号 3)、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain, LC3B) 抗体 (批号 3)、p62 抗体 (批号 4)、p-mTOR 抗体 (批号 12)、p-S6 抗体 (批号 21)、抗兔二抗 (批号 28) 购自美国 CST 公司; 天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 试剂盒 (批号 20201205)、丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 试剂盒 (批号 20201203) 购自南京建成生物科技有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 091823240222)、EdU-488 细胞增殖检测试剂盒 (批号 071821211124)、Western 及 IP 细胞裂解液 (批号 030722220523) 均购自上海碧云天生物技术有限公司; 其他试剂均为分析试剂, 购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 仪器

Legend Micro 21R 型高速冷冻离心机、超微量

分光亮度计[赛默飞世尔科技(中国)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、RT-PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司); AR224CN 型电子天平(上海奥豪斯仪器有限公司); VORTEX-5 型涡旋混合仪(上海析域仪器设备有限公司); IMS-20 型雪花制冰机(常熟市雪科电器有限公司); Alpha Imager HP 型凝胶成像系统(美国 Alpha 科技有限公司); Ti2-U 型荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药

2.1.1 黄芩苷对 APAP 诱导的肝损伤小鼠的保护作用 C57BL/6 小鼠随机分成对照组、模型组和黄芩苷(40、80 mg/kg)组, 每组 12 只。对照组 ip 生理盐水后 1 h, ig 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液; 模型组和各给药组 ip APAP(300 mg/kg)后 1 h, ig 0.5% CMC-Na 溶液或黄芩苷溶液。ip APAP 24 h 或 48 h 后解剖取材, 处死前 4 h ip EDU(50 mg/kg)。

2.1.2 mTOR 抑制剂雷帕霉素对黄芩苷保肝作用的影响 C57BL/6 小鼠随机分成对照组、模型组、黄芩苷(40 mg/kg)组和黄芩苷(40 mg/kg)+雷帕霉素(2.5 mg/kg)组, 每组 12 只。对照组 ip 生理盐水后 1 h, ig 0.5% CMC-Na 溶液; 模型组和各给药组 ip APAP(300 mg/kg)后 1 h, ig 0.5% CMC-Na 溶液或黄芩苷溶液或同时 ip 雷帕霉素。ip APAP 24 h 或 48 h 后解剖取材, 处死前 4 h ip EDU(50 mg/kg)。

2.2 血清中 ALT 和 AST 活性检测

给药结束后, 眼球取血, 将小鼠血清样本放入 1.5 mL 离心管中, 放置在碎冰内静置 3 h, 然后将样本放入高速冷冻离心机, 4 °C、3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液。按试剂盒说明书检测血清中 ALT 和 AST 活性。

2.3 肝组织病理学观察

小鼠处死后解剖取出肝脏, 将肝大叶放置在 10%福尔马林中固定过夜, 然后经医用全自动脱水机脱水后进行石蜡包埋, 用切片机进行切片。接着用梯度乙醇进行脱蜡处理, 并用苏木素-伊红(HE)染液进行染色, 最后固定于载玻片中。在光学显微镜下观察, 每个切片样本拍摄 3 个随机区域的相片进行坏死面积统计。

2.4 免疫组化染色检测肝脏组织 PCNA 表达

石蜡包埋的肝脏切片固定后, 使用 3%过氧化

氢淬灭, 5%牛血清白蛋白孵育, 加入 PCNA 抗体 4 °C 孵育过夜, 之后采用 DAKO EnVision 检测试剂盒检测。在显微镜下采集图像, 每个样本取 3 个随机视野(每组 4 个样本), 用 Image J 软件人工计数 PCNA 阳性细胞。

2.5 EDU 细胞增殖实验检测肝脏细胞增殖情况

石蜡包埋的肝脏切片在二甲苯中脱蜡, 然后经梯度乙醇复水, 用 EdU 细胞增殖测定试剂盒检测细胞增殖情况, 于荧光显微镜下观察并拍照。

2.6 qRT-PCR 检测肝脏组织表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF) mRNA 表达

按照试剂盒说明书提取肝脏组织总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
<i>β-actin</i>	F: GGGAAATCGTGCTGAC R: AGGCTGGAAAAGAGCCT
<i>EGF</i>	F: AGAGCATCTCGGATTGACC R: CCCGTTAAGGAAAACCTCTTAGCA
<i>HGF</i>	F: AACAGGGGTTTACGTTCACT R: CGTCCCTTTATAGCTGCCTCC

2.7 Western blotting 实验检测肝脏组织 PCNA、Cyclin D1、LC3B、p62、p-mTOR、p-S6 蛋白表达

取肝组织, 加入裂解液匀浆提取总蛋白, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 蛋白样品经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, 分别孵育一抗和二抗, 用 ECL 化学发光试剂盒进行显影。用 Alpha Fluor Chem 凝胶成像仪检测蛋白条带, 并对条带进行灰度值分析。

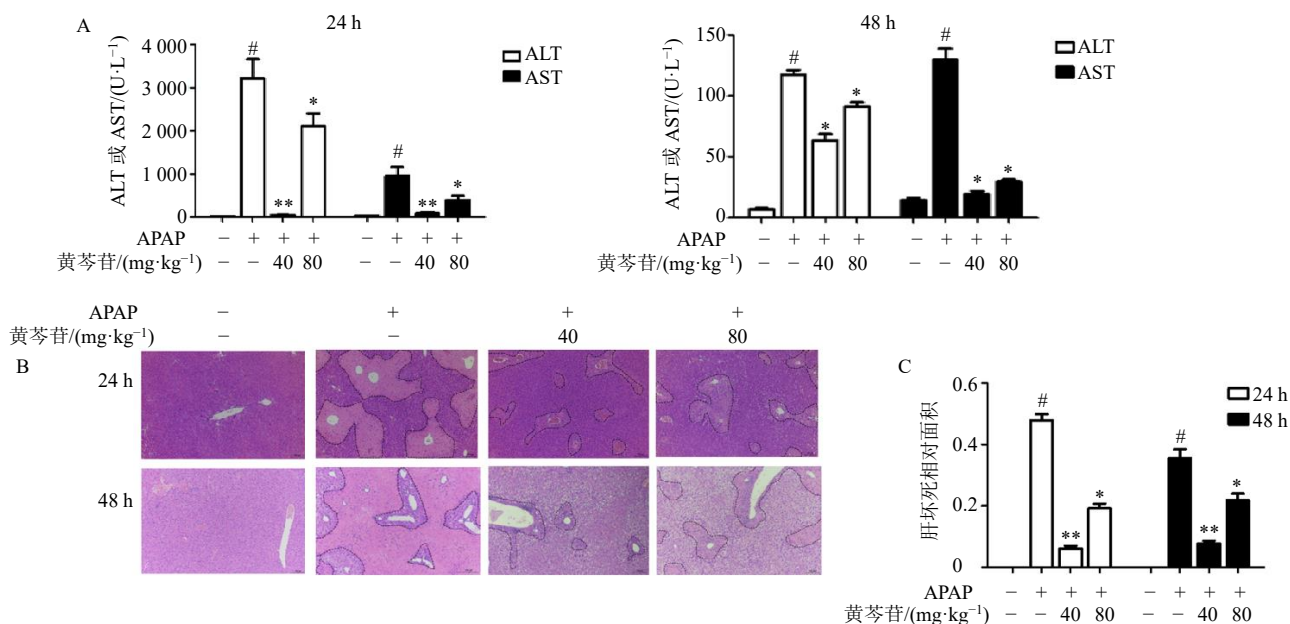
2.8 统计学分析

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 黄芩苷减轻 APAP 诱导的小鼠肝损伤

为了评估肝损伤的程度, 检测了小鼠血清中 ALT 和 AST 活性。如图 1-A 所示, 给予 APAP 24 h 或 48 h, 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, 各剂量黄芩苷处理后均显著降低了小鼠血清中 ALT 和 AST 活性



A-小鼠 ip APAP 24、48 h 后血清中 ALT 和 AST 活性 (n=6); B-肝脏组织 HE 染色 (×100), 虚线为坏死面积; C-肝脏坏死相对面积 (n=6); 与对照组比较: #P<0.05; 与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01, 下同。

A-activities of ALT and AST in serum of mice after 24, 48 h of ip APAP (n = 6); B-HE staining of liver tissue (× 100), dotted line represents necrotic area; C-liver necrosis relative area (n = 6); #P < 0.05 vs control group; *P < 0.05 **P < 0.01 vs model group, same as below figures.

图1 黄芩苷抑制 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤

Fig. 1 Baicalin inhibits APAP-induced acute liver injury in mice

($P < 0.05$ 、 0.01)。如图 1-B 所示, 与模型组比较, 黄芩苷明显抑制小鼠肝内出血、核固缩和肝细胞死亡, 从而减轻 APAP 诱导的肝损伤。如图 1-C 所示, 给予 APAP 24 h 或 48 h, 小鼠肝坏死面积增加, 而黄芩苷显著减少了坏死面积 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且 40 mg/kg 黄芩苷作用较好。

3.2 黄芩苷促进 APAP 诱导的小鼠肝细胞增殖

如图 2-A、B 所示, 给予 APAP 24 h 或 48 h, 有丝分裂肝细胞数量显著减少 ($P < 0.05$); 黄芩苷 (40、80 mg/kg) 治疗后显著增加 APAP 诱导的小鼠有丝分裂肝细胞数 ($P < 0.05$), 提示可能发生肝再生。据报道, 黄芩苷能够促进肝细胞的体外增殖^[20]。本研究中也观察到这种现象, 如图 2-C、D 所示, 给予 APAP 24 h 或 48 h, 小鼠肝脏 EDU 荧光强度微弱, 肝细胞增殖率显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 黄芩苷 (40、80 mg/kg) 治疗后肝脏 EDU 荧光强度增强, 肝细胞增殖率显著升高 ($P < 0.05$)。

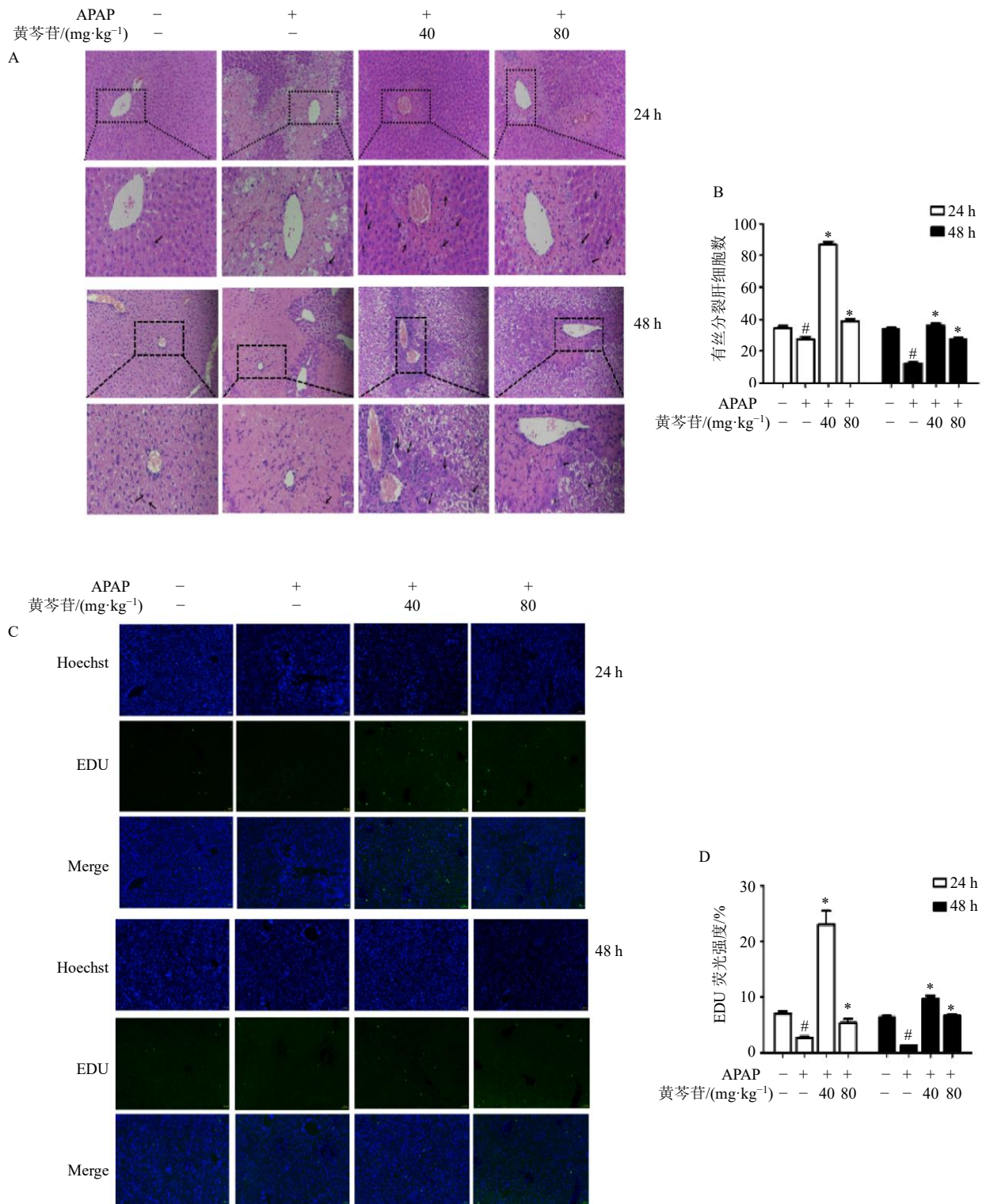
3.3 黄芩苷促进 APAP 诱导的小鼠肝脏中生长因子和细胞周期蛋白的表达

生长因子具有诱导受损肝细胞再生和修复的能力^[21]。如图 3-A、B 所示, 给予 APAP 24 h 或 48 h,

与模型组比较, 40、80 mg/kg 黄芩苷显著升高小鼠肝脏组织 *HGF*、*EGF* mRNA 表达水平 ($P < 0.05$)。如图 3-C、D 所示, 黄芩苷显著增加 APAP 诱导的小鼠肝脏组织中 PCNA 染色阳性肝细胞数量 ($P < 0.05$ 、 0.01)。Western blotting 结果 (图 3-E~G) 显示, 与对照组比较, 给予 APAP 24 h 或 48 h, 小鼠肝脏组织 PCNA 和 Cyclin D1 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$); 给予 40 mg/kg 黄芩苷治疗后, 小鼠肝脏组织 PCNA 和 Cyclin D1 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

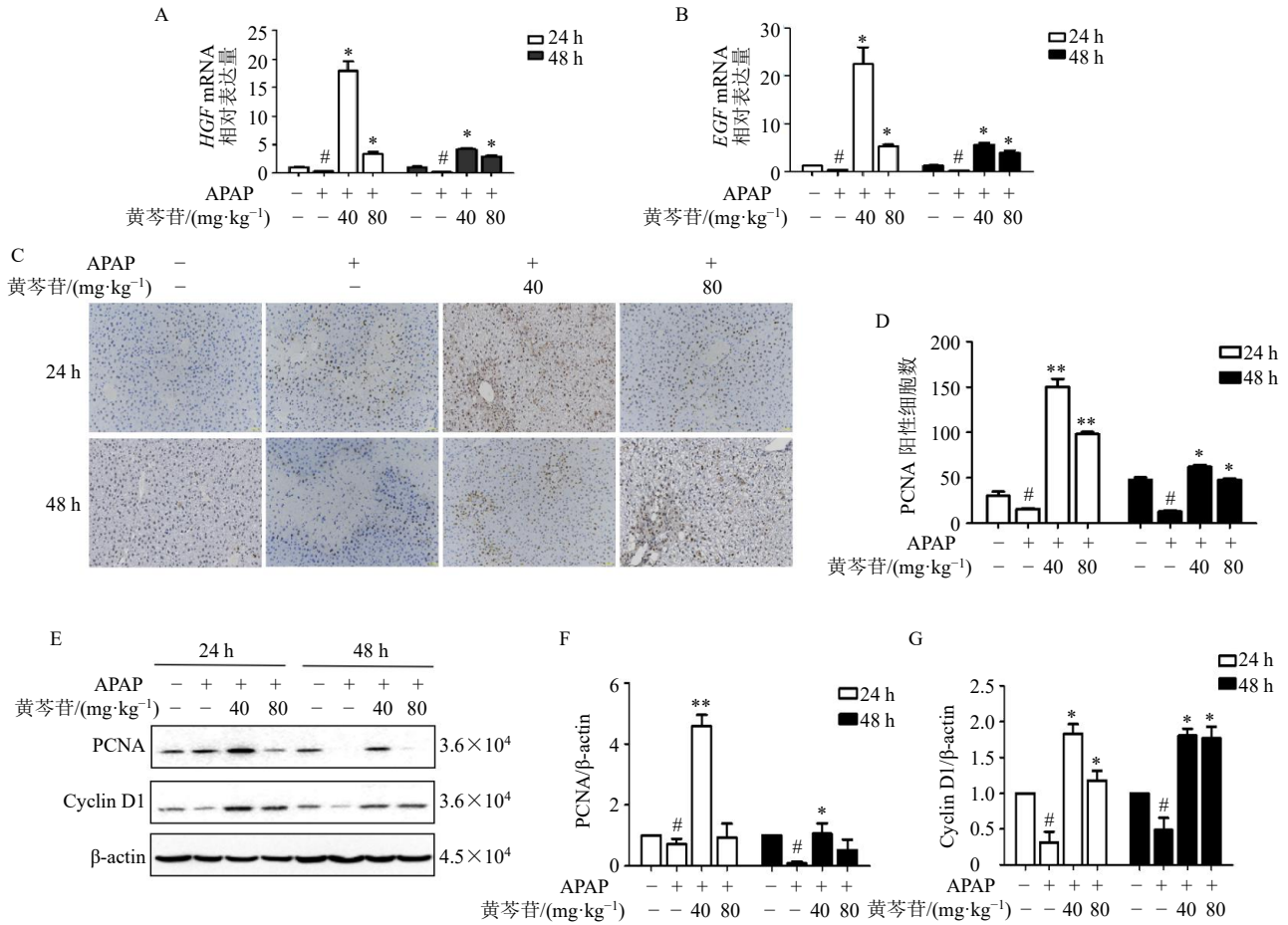
3.4 黄芩苷激活 mTOR 信号通路

通过检测 p62、LC3B、p-mTOR 和 p-S6 蛋白表达的变化来评估黄芩苷是否激活 mTOR 信号通路。如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝脏组织 p62、p-mTOR 和 p-S6 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), LC3B 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 黄芩苷治疗后小鼠肝脏组织中 p62、p-mTOR 和 p-S6 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), LC3B 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 但 24 h 黄芩苷 (40 mg/kg) 组和 48 h 黄芩苷 (80 mg/kg) 组 p-S6 蛋白表达水平无统计学差异。



A-小鼠 ip APAP 24、48 h 后肝脏组织学观察 (×100), 箭头表示有丝分裂的肝细胞; B-有丝分裂的肝细胞计数 (n=6); C-小鼠 ip APAP 24、48 h 后肝脏细胞增殖情况 (×100); D-肝细胞增殖率 (n=6)。
 A-observation of liver histology in mice after 24, 48 h of ip APAP (× 100), arrows indicate mitotic liver cells; B-mitotic liver cell count (n = 6); C-proliferation of liver cells in mice after 24, 48 h of ip APAP (× 100); D-liver cell proliferation rate (n = 6).

图 2 黄芩苷促进 APAP 诱导的小鼠肝细胞增殖
 Fig. 2 Baicalin promotes APAP-induced proliferation of liver cells in mice



A、B-小鼠 ip APAP 24 h 或 48 h 后肝脏组织 *HGF*、*EGF* mRNA 表达 ($n=6$)；C-肝脏组织 PCNA 免疫组化染色 ($\times 100$)；D-PCNA 阳性细胞数 ($n=3$)；E~G-小鼠 ip APAP 24 h 或 48 h 后肝脏组织 PCNA 和 Cyclin D1 蛋白表达 ($n=6$)。

A, B-*HGF*, *EGF* mRNA expressions in liver tissue of mice after 24 h or 48 h of ip APAP ($n=6$); C-PCNA immunohistochemical staining in liver tissue ($\times 100$); D-PCNA positive cell count ($n=3$); E~G-expressions of PCNA and Cyclin D1 protein in liver tissue of mice after 24 h or 48 h of ip APAP ($n=6$).

图 3 黄芩苷促进 APAP 诱导的小鼠肝脏中生长因子和细胞周期蛋白的表达

Fig. 3 Baicalin promotes expressions of growth factors and cyclin in liver tissue of APAP-induced mice

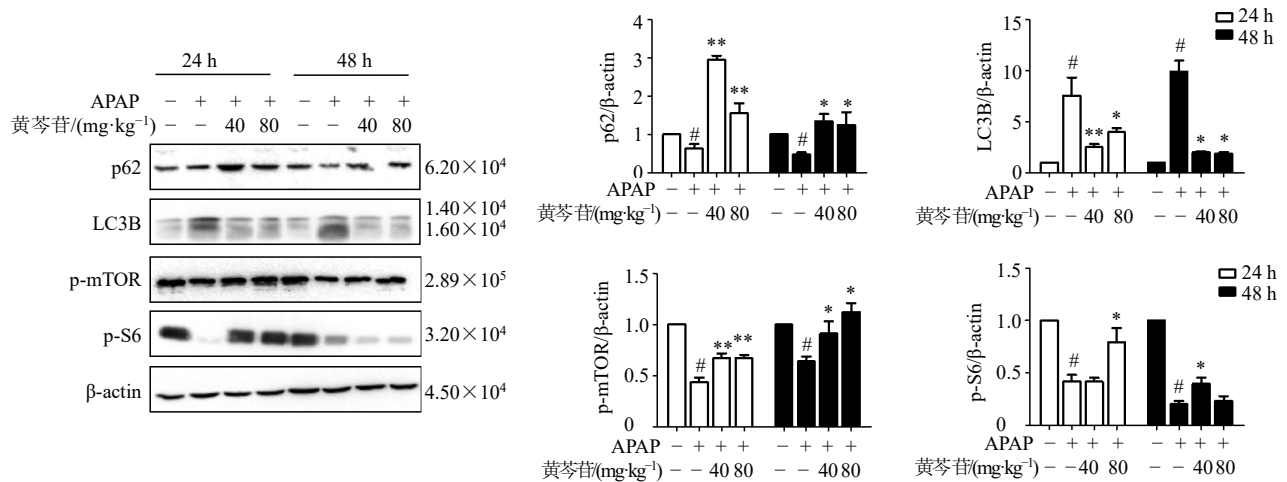


图 4 黄芩苷激活 mTOR 信号通路 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 4 Baicalin activates mTOR signaling pathway ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.5 雷帕霉素抑制黄芩苷激活 mTOR 信号通路

为了进一步证实 mTOR 信号通路在黄芩苷增强肝细胞增殖、促进肝脏修复中的作用,使用 mTOR 抑制剂雷帕霉素进行干预,结果显示,随着剂量的升高,雷帕霉素对 mTOR 的抑制作用越明显 ($P < 0.05$ 、 0.01 , 图 5-A)。因此,以 2.5 mg/kg 雷帕霉素进行后续实验。

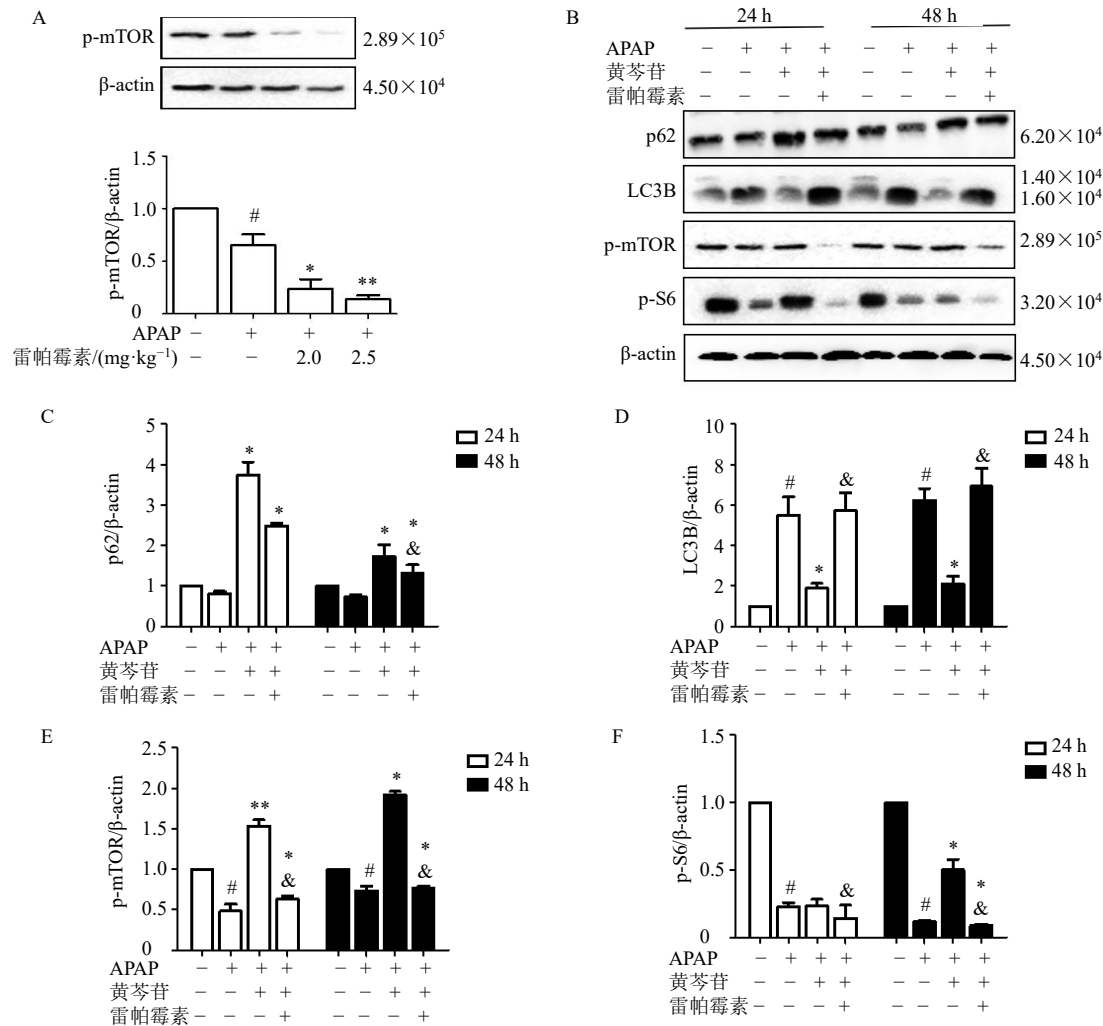
通过 Western blotting 检测 mTOR 信号通路相关蛋白,观察雷帕霉素是否抑制了黄芩苷对 mTOR 信号通路的激活。如图 5-B~F 所示,给予 APAP 24 h, 40 mg/kg 黄芩苷显著增加 p62、p-mTOR 和 p-S6 的蛋白表达 ($P < 0.05$), 降低 LC3B 的蛋白表达

($P < 0.05$); 小鼠 ip 雷帕霉素 (2.5 mg/kg) 后可以明显降低 p-mTOR 和 p-S6 的蛋白表达 ($P < 0.05$), 增加 LC3B 的蛋白表达 ($P < 0.05$)。

给予 APAP 48 h, 40 mg/kg 黄芩苷显著增加 p62 和 p-mTOR 的蛋白表达 ($P < 0.05$), 降低 LC3B 的蛋白表达 ($P < 0.05$); 给予雷帕霉素后能明显逆转上述现象 ($P < 0.05$), 并且发现上述所有现象在给予 APAP 24 h 效果最好。表明黄芩苷对肝损伤后的修复作用可能与激活 mTOR 信号通路有关。

3.6 雷帕霉素抑制黄芩苷的保肝作用

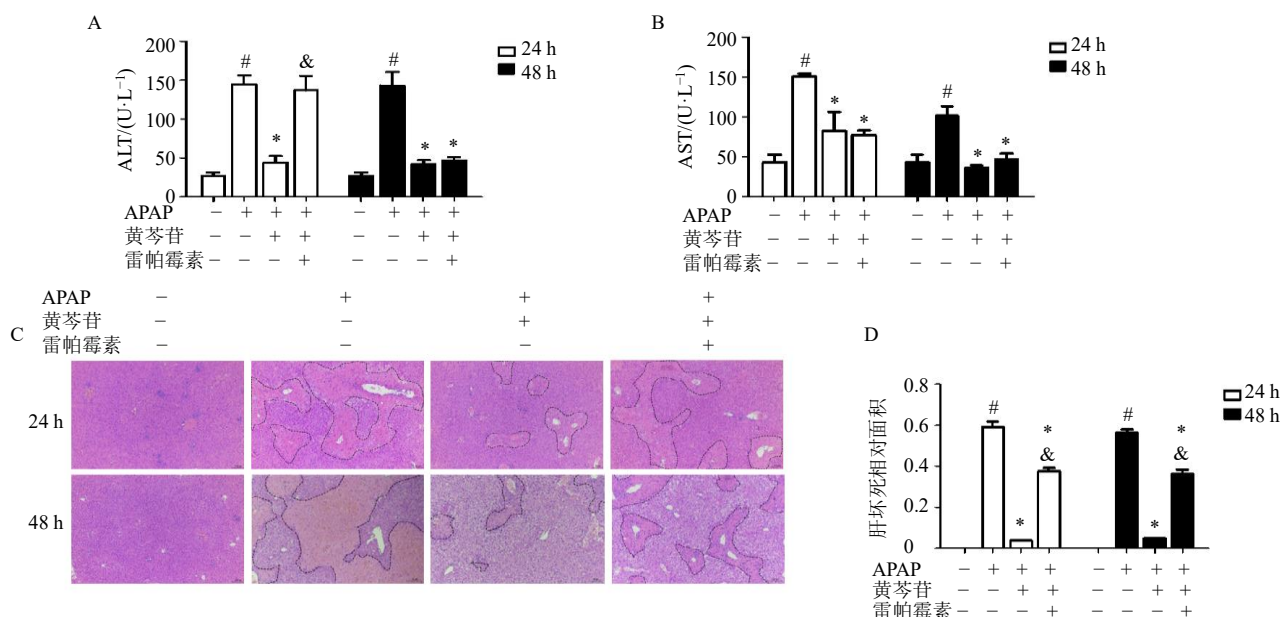
血清中 ALT 和 AST 活性可以反映肝损伤的损伤程度。如图 6-A、B 所示,与对照组比较,模型组



A-小鼠 ip APAP 1 h 后给予雷帕霉素, APAP 处理 24 h 检测肝脏组织 p-mTOR 蛋白表达; B~F-小鼠 ip APAP 1 h 后给予雷帕霉素或黄芩苷, APAP 处理 24 h 或 48 h 检测肝脏组织 p62、LC3B、p-mTOR 和 p-S6 蛋白表达; 与黄芩苷组比较: * $P < 0.05$, 下同。
A-mice were given rapamycin 1 h after ip APAP, p-mTOR protein expression in liver tissue was detected after APAP treatment for 24 h; B~F-mice were treated with rapamycin or baicalin after 1 h of ip APAP, p62, LC3B, p-mTOR and p-S6 protein expressions in liver tissue was detected after APAP treatment for 24 h or 48 h; * $P < 0.05$ vs baicalin group, same as below figures.

图 5 雷帕霉素抑制黄芩苷激活 mTOR 信号通路 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Rapamycin inhibits activation of mTOR signaling pathway by baicalin ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



A-小鼠 ip APAP 1 h 后给予雷帕霉素或黄芩苷，APAP 处理 24 h 或 48 h 检测血清中 ALT 活性 ($n=6$)；B-小鼠 ip APAP 1 h 后给予雷帕霉素或黄芩苷，APAP 处理 24 h 或 48 h 检测血清中 AST 活性 ($n=6$)；C-肝脏组织 HE 染色 ($\times 100$)，虚线为坏死面积；D-肝脏坏死相对面积 ($n=6$)。A-mice were treated with rapamycin or baicalin after 1 h of ip APAP, ALT activity in serum of mice was detected after 24 h or 48 h of ip APAP ($n=6$)；B-mice were treated with rapamycin or baicalin after 1 h of ip APAP, AST activity in serum of mice was detected after 24 h or 48 h of ip APAP ($n=6$)；C- HE staining of liver tissue ($\times 100$), dotted line represents necrotic area；D-liver necrosis relative area ($n=6$)。

图 6 雷帕霉素抑制黄芩苷对肝脏的保护作用

Fig. 6 Rapamycin inhibits protective effect of baicalin on liver

小鼠血清中 ALT 和 AST 活性显著升高 ($P<0.05$)，给予黄芩苷后能显著降低 APAP 诱导的小鼠血清中 ALT 和 AST 活性 ($P<0.05$)。给予 APAP 24 h，雷帕霉素能明显取消黄芩苷降低血清 ALT 活性的作用。给予 APAP 48 h，雷帕霉素对黄芩苷降低 ALT 和 AST 活性的作用无显著影响。

如图 6-C 所示，从小鼠肝脏病理切片可以观察到，对照组肝细胞没有坏死，并且以肝小叶中间为中心向周围呈放射状排列，而模型组出现大量坏死的肝细胞以及肝出血，肝细胞的边界模糊不清。黄芩苷治疗后坏死的肝细胞减少，肝出血也得以明显改善。给予雷帕霉素后坏死细胞明显增加，肝细胞边界模糊并带有少许空泡样变。将肝脏切片中坏死面积进行量化 (图 6-D)，发现给予 APAP 后，肝坏死面积显著增加 ($P<0.05$)，给予黄芩苷后能明显减少坏死面积 ($P<0.05$)，给予雷帕霉素后能明显抑制黄芩苷对肝损伤面积的改善作用 ($P<0.05$)。表明雷帕霉素可以抑制黄芩苷对肝脏的保护作用。

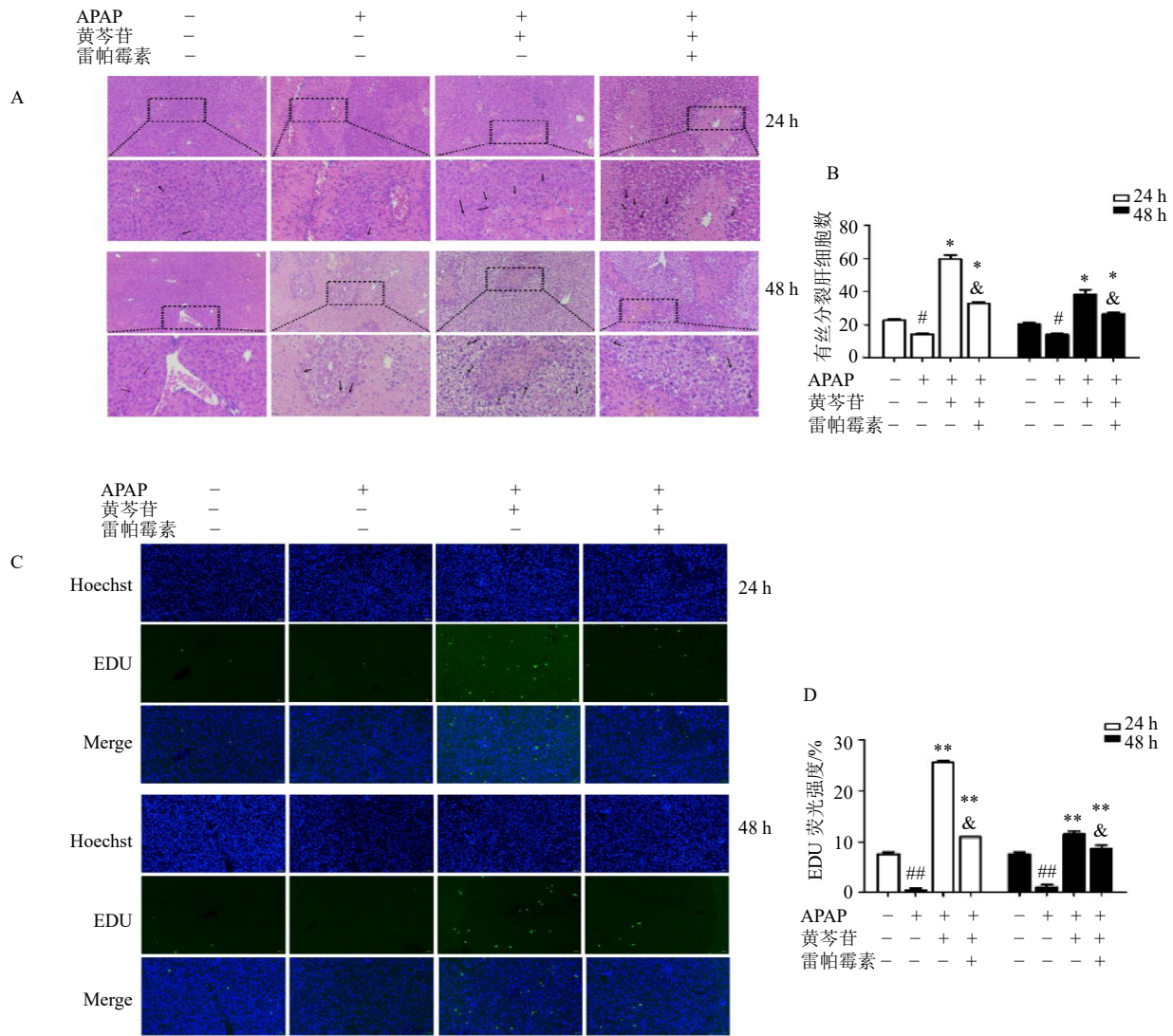
3.7 雷帕霉素抑制黄芩苷促肝细胞增殖的作用

如图 7-A、B 所示，给予 APAP 24 h 或 48 h，小鼠有丝分裂肝细胞数显著减少 ($P<0.05$)；黄芩苷干预后可以显著增加 APAP 诱导的小鼠有丝分裂

肝细胞数 ($P<0.05$)，而雷帕霉素可以逆转这一改变 ($P<0.05$)。EDU 细胞增殖实验也得到了相似的结果，如图 7-C、D 所示，给予 APAP 24 h 或 48 h，小鼠肝脏 EDU 荧光强度微弱，肝细胞增殖率显著降低 ($P<0.01$)；给予黄芩苷治疗后肝脏 EDU 荧光强度增强，肝细胞增殖率显著升高 ($P<0.01$)；给予雷帕霉素后荧光强度变弱，肝细胞增殖率显著降低 ($P<0.05$)。表明雷帕霉素可以抑制黄芩苷促肝细胞增殖的作用。

3.8 雷帕霉素抑制黄芩苷诱导的增殖相关蛋白的表达

如图 8-A、B 所示，给予 APAP 24 h 或 48 h，小鼠肝脏组织中 PCNA 染色阳性细胞数量显著降低 ($P<0.05$)；给予黄芩苷后显著增加 APAP 诱导的小鼠肝脏组织中 PCNA 染色阳性细胞数量 ($P<0.05$)，而给予雷帕霉素后小鼠肝脏组织中 PCNA 阳性细胞数明显减少 ($P<0.05$)。Western blotting 结果 (图 8-C~E) 显示，如图 8-C~E 所示，与模型组比较，黄芩苷给药后小鼠肝脏组织中 PCNA 和 Cyclin D1 的蛋白表达显著升高 ($P<0.05$)，给予雷帕霉素后能够逆转黄芩苷对 PCNA 和 Cyclin D1 表达的上调作用 ($P<0.05$)。



A-小鼠 ip APAP 1 h 后给予雷帕霉素或黄芩苷，APAP 处理 24、48 h 观察肝脏组织学变化 (×100)，箭头表示有丝分裂的肝细胞；B-有丝分裂的肝细胞计数 (n=6)；C-小鼠 ip APAP 1 h 后给予雷帕霉素或黄芩苷，APAP 处理 24、48 h 检测肝脏细胞增殖情况 (×100)；D-肝细胞增殖率 (n=6)。

A-mice were treated with rapamycin or baicalin after 1 h of ip APAP, liver histology of mice was observed after 24, 48 h of ip APAP (× 100), arrows indicate mitotic liver cells; B-mitotic liver cell count (n = 6); C-mice were treated with rapamycin or baicalin after 1 h of ip APAP, proliferation of liver cells was detected after 24, 48 h of ip APAP (× 100); D-liver cell proliferation rate (n = 6).

图 7 雷帕霉素抑制黄芩苷促肝细胞增殖的作用

Fig. 7 Rapamycin inhibits pro-proliferative effect of baicalin on hepatocytes

4 讨论

肝脏的再生受多种细胞因子和生长因子以及信号通路调控的影响^[22]。APAP 给药后 6 h 出现急性肝损伤，而 APAP 给药后约 12 h 出现肝再生^[23-24]。据报道，PCNA 和 Cyclin D1 在调节肝脏再生中起着关键作用^[25]。为了研究黄芩苷对 APAP 诱导的急性肝损伤后肝脏再生的修复作用，分别于 APAP 处理后 24 h 和 48 h 处死小鼠，发现黄芩苷减少了肝

坏死面积，增加了肝细胞的有丝分裂和 EDU 阳性数量，提高了肝脏组织 PCNA 和 Cyclin D1 蛋白表达，提示黄芩苷对 APAP 诱导的急性肝损伤具有促进肝再生的作用。mTOR 能够调节细胞增殖和生长速度，并在肝脏再生中发挥重要作用^[26-27]。然而，少有研究关注 mTOR 通路在 APAP 诱导的急性肝损伤后肝脏再生中的作用。本研究发现黄芩苷激活 mTOR 信号通路，在 APAP 处理后 24 h 和 48 h 促

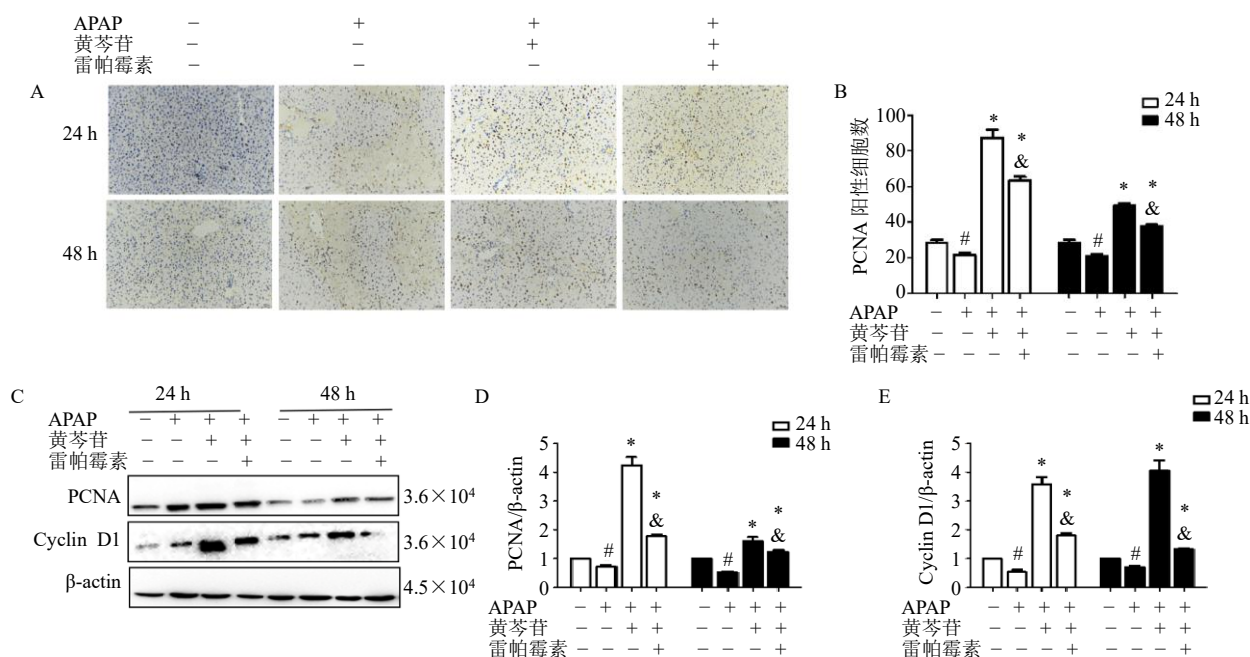


图 8 雷帕霉素抑制黄芩苷诱导的增殖相关蛋白的表达
Fig. 8 Rapamycin inhibits expressions of proliferation-related proteins induced by baicalin

进肝脏修复。

mTOR 促进下游靶标 p70S6K 和 4E-BP1 的磷酸化，从而刺激细胞周期从 G₁ 期到 S 期所需的蛋白质翻译^[28]。胰岛素、EGF 和 FGF 以及 G 蛋白偶联受体配体可调节 p70S6K 的活性^[29-30]。当生长因子和丝裂原激活 p70S6 激酶时，会导致 S6 核糖体蛋白磷酸化^[31]。S6 核糖体蛋白的磷酸化与 mRNA 转录物的翻译增加有关，并参与细胞周期进程，从而有效促进细胞生长和增殖^[32]。本研究发现黄芩苷可以上调 mTOR 和 S6 的磷酸化，同时能显著提高 APAP 诱导的急性肝损伤小鼠肝脏组织 HGF 和 EGF mRNA 表达水平，表明黄芩苷促进肝细胞增殖和肝修复的机制可能与 mTOR 信号通路的激活有关。雷帕霉素是一种经典的 mTOR 抑制剂^[33]，用于进一步研究黄芩苷诱导的肝再生作用机制。结果显示，雷帕霉素显著抑制了黄芩苷对肝再生的促进作用，表明黄芩苷促进 APAP 肝损伤后肝脏的修复与激活 mTOR 信号通路密切相关。

自噬是一种形成自噬体的细胞过程，自噬体是包裹细胞质物质的双层膜结构^[34]。p62 蛋白具有多

种功能，不仅可以作为自噬的选择性底物，还可以与 Rag C 和 Raptor 特异性相互作用，从而以氨基酸依赖的方式促进 mTOR 的激活^[35-37]。p62 在自噬中起双向作用，一方面，细胞内 p62 水平受自噬活性的调控；另一方面，p62 也可通过激活 mTORC1 信号通路负调控自噬活性^[38-39]。在自噬过程中，p62 与泛素化的蛋白质结合，与 LC3B 相互作用渗入到自噬体并通过自噬溶酶体有效地降解^[40]。LC3B 是一种自噬标记物，指示自噬囊泡的形成，并诱导 LC3B-I 向 LC3B-II 转变^[41-42]。本研究结果表明黄芩苷能够抑制 LC3B-I 向 LC3B-II 转化，并显著增加 p62 和 p-mTOR 的蛋白表达水平。

综上，本研究发现黄芩苷能够减轻 APAP 诱导的肝损伤，促进肝细胞增殖，上调 EGF、HGF、PCNA、Cyclin D1 的表达。从而加速肝脏修复，这与其激活 mTOR 信号通路促进细胞增殖、抑制自噬密切相关。目前对黄芩苷拮抗急性肝损伤作用的研究大多数为预防性给药或是对肝脏早期损伤（6 h 内）的治疗，而对损伤后修复期的干预作用却鲜见报道，本研究从体内系统阐释了黄芩苷拮抗 APAP

肝损伤后的修复作用，并利用信号通路抑制剂，在整体动物水平通过靶向调控 mTOR 信号通路，揭示了黄芩苷促进对 APAP 肝损伤后肝脏修复的机制。但由于条件限制未在转基因动物以及体外细胞水平上进一步验证，这也将是后续的研究内容之一。本研究为 APAP 肝损伤和其他肝损伤后的肝脏修复提供新的策略，为黄芩苷保肝作用的进一步发掘提供实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lee W M. Drug-induced acute liver failure [J]. *Clin Liver Dis*, 2013, 17(4): 575-586.
- [2] Blieden M, Paramore L C, Shah D, et al. A perspective on the epidemiology of acetaminophen exposure and toxicity in the United States [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2014, 7(3): 341-348.
- [3] Miao X L, Jin C T, Liu J, et al. Honokiol attenuates acetaminophen-induced acute liver injury by inhibiting hepatic CYP1A2 activity and improving liver mitochondrial dysfunction [J]. *Chin Herb Med*, 2023, 15(2): 231-239.
- [4] Hinson J A, Roberts D W, James L P. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2010(196): 369-405.
- [5] Rumack B H, Bateman D N. Acetaminophen and acetylcysteine dose and duration: Past, present and future [J]. *Clin Toxicol*, 2012, 50(2): 91-98.
- [6] Heard K J. Acetylcysteine for acetaminophen poisoning [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(3): 285-292.
- [7] McNulty R, Lim J M E, Chandru P, et al. Fewer adverse effects with a modified two-bag acetylcysteine protocol in paracetamol overdose [J]. *Clin Toxicol*, 2018, 56(7): 618-621.
- [8] Rahman M A, Midde N M, Wu X X, et al. Kinetic characterizations of diallyl sulfide analogs for their novel role as CYP2E1 enzyme inhibitors [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2017, 5(5): e00362.
- [9] Bochoráková H, Paulová H, Slanina J, et al. Main flavonoids in the root of *Scutellaria baicalensis* cultivated in Europe and their comparative antiradical properties [J]. *Phytother Res*, 2003, 17(6): 640-644.
- [10] Dinda B, Dinda S, DasSharma S, et al. Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone, baicalein against inflammatory disorders [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 131: 68-80.
- [11] 赵麓, 张行行, 孙欠欠, 等. 基于NLRP3炎症小体研究黄芩苷联合栀子苷防治缺血性脑卒中及并发心肌损伤的作用机制 [J]. *中草药*, 2023, 54(6): 1833-1841.
- [12] Shi L, Hao Z X, Zhang S B, et al. Baicalein and baicalin alleviate acetaminophen-induced liver injury by activating Nrf2 antioxidative pathway: The involvement of ERK1/2 and PKC [J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 150: 9-23.
- [13] Sun Y K, Zhang Y F, Xie L, et al. Progress in the treatment of drug-induced liver injury with natural products [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 183: 106361.
- [14] Yang J Y, Li M, Zhang C L, et al. Pharmacological properties of baicalin on liver diseases: A narrative review [J]. *Pharmacol Rep*, 2021, 73(5): 1230-1239.
- [15] Mardanshahi A, Gharibkandi N A, Vaseghi S, et al. The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway inhibitors enhance radiosensitivity in cancer cell lines [J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(8): 1-14.
- [16] Koh P O, Cho J H, Won C K, et al. Estradiol attenuates the focal cerebral ischemic injury through mTOR/p70S6 kinase signaling pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2008, 436(1): 62-66.
- [17] Zhang Y J, Dai Q, Sun D F, et al. mTOR signaling pathway is a target for the treatment of colorectal cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2009, 16(9): 2617-2628.
- [18] Manjunathan R, Devarajan N, Ragunathan M. Possible mechanism of human recombinant leptin-induced VEGF A synthesis via PI3K/Akt/mTOR/S6 kinase signaling pathway while inducing angiogenesis: An analysis using chicken chorioallantoic membrane model [J]. *J Vasc Res*, 2021, 58(6): 343-360.
- [19] Ou J M, Qui M K, Dai Y X, et al. Combined blockade of AKT/mTOR pathway inhibits growth of human hemangioma via downregulation of proliferating cell nuclear antigen [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2012, 25(4): 945-953.
- [20] Kulebyakin K Y, Nimiritsky P P, Makarevich P I. Growth factors in regeneration and regenerative medicine: "the cure and the cause" [J]. *Front Endocrinol*, 2020, 11: 384.
- [21] Michalopoulos G K. Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance [J]. *Hepatology*, 2017, 65(4): 1384-1392.
- [22] Bhushan B, Chavan H, Borude P, et al. Dual role of epidermal growth factor receptor in liver injury and regeneration after acetaminophen overdose in mice [J]. *Toxicol Sci*, 2017, 155(2): 363-378.
- [23] 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.
- [24] Sherr C J. G₁ phase progression: Cycling on cue [J]. *Cell*, 1994, 79(4): 551-555.
- [25] Zhou H C, Wang H, Shi K, et al. Hepatoprotective effect

- of baicalein against acetaminophen-induced acute liver injury in mice [J]. *Molecules*, 2018, 24(1): 131.
- [26] Laplante M, Sabatini D M. mTOR signaling in growth control and disease [J]. *Cell*, 2012, 149(2): 274-293.
- [27] Chao X J, Wang H, Jaeschke H, *et al.* Role and mechanisms of autophagy in acetaminophen-induced liver injury [J]. *Liver Int*, 2018, 38(8): 1363-1374.
- [28] Qiu F, Zhao X. Study on the sensitivity of primary tumor cells of patients with cervical cancer to chemotherapeutic combinations [J]. *J BUON*, 2018, 23(1): 117-123.
- [29] Petritsch C, Beug H, Balmain A, *et al.* TGF-beta inhibits p70 S6 kinase via protein phosphatase 2A to induce G(1) arrest [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(24): 3093-3101.
- [30] Martin K A, Schalm S S, Romanelli A, *et al.* Ribosomal S6 kinase 2 inhibition by a potent C-terminal repressor domain is relieved by mitogen-activated protein-extracellular signal-regulated kinase kinase-regulated phosphorylation [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(11): 7892-7898.
- [31] Lyu J W, Xu X B, Ji K Q, *et al.* Activated mTOR signaling pathway in myofibers with inherited metabolic defect might be an evidence for mTOR inhibition therapies [J]. *Chin Med J*, 2019, 132(7): 805-810.
- [32] Sridharan S, Basu A. Distinct roles of mTOR targets S6K1 and S6K2 in breast cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4): 1199.
- [33] Oya M. mTOR inhibitors [J]. *Nihon Rinsho*, 2010, 68(6): 1067-1071.
- [34] Parzych K R, Klionsky D J. An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(3): 460-473.
- [35] Manley S, Williams J A, Ding W X. Role of p62/SQSTM1 in liver physiology and pathogenesis [J]. *Exp Biol Med*, 2013, 238(5): 525-538.
- [36] Shen Z Y, Wang Y, Su Z H, *et al.* Activation of p62-keap1-Nrf2 antioxidant pathway in the early stage of acetaminophen-induced acute liver injury in mice [J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 282: 22-28.
- [37] Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor [J]. *FEBS J*, 2015, 282(24): 4672-4678.
- [38] Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: The p62/SQSTM1 paradigm [J]. *Essays Biochem*, 2017, 61(6): 609-624.
- [39] Jeong S J, Zhang X Y, Rodriguez-Velez A, *et al.* p62/SQSTM1 and selective autophagy in cardiometabolic diseases [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 31(6): 458-471.
- [40] Pankiv S, Clausen T H, Lamark T, *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(33): 24131-24145.
- [41] Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(7): 713-720.
- [42] Lamb C A, Yoshimori T, Tooze S A. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(12): 759-774.

[责任编辑 李亚楠]