

独活醇提取物对四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤的保护作用及机制

吴诗慧¹, 龙潇云¹, 赵邯涛¹, 袁吕江^{1,2}, 陈前鋒^{1,2*}

1. 西南大学药学院, 重庆 400715

2. 西南大学 黄连开发与利用教育部工程研究中心, 重庆 400715

摘要: **目的** 研究独活醇提取物对四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) 致小鼠急性肝损伤的保护作用及作用机制。 **方法** 60 只雄性昆明小鼠随机分为对照组、模型组、水飞蓟宾 (63 mg/kg) 组和独活醇提取物低、中、高剂量 (50、150、300 mg/kg) 组, 每组 10 只。连续给药 1 周, 于末次给药 2 h 后 ip 0.2% CCl₄ 溶液致小鼠急性肝损伤, 24 h 后收集血清和肝脏组织。采用试剂盒检测小鼠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)、过氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性和谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 含量; 采用试剂盒检测肝组织中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和 IL-1 β 水平; 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色法观察肝组织病理变化; 采用 Western blotting 检测肝组织 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)、髓分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88)、磷酸化 κ B 抑制蛋白激酶 (phosphorylated κ B inhibitor protein kinase, p-IKK)、磷酸化 I κ B- α 抑制蛋白 (phosphorylated κ B alpha kinase, p-I κ B α)、磷酸化核因子- κ B p65 (phosphorylated nuclear factor- κ B p65, p-p65)、TNF- α 、核因子 E2 相关因子 (nuclear factor erythroid-derived factor 2-related factor, Nrf2) 和血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 蛋白表达。 **结果** 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 AST、ALT 活性显著升高 ($P < 0.001$), GSH 水平和 SOD 活性显著下降 ($P < 0.01$), 肝组织 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.001$), 肝组织中 Nrf2/HO-1 和 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路相关蛋白表达显著上调 ($P < 0.05$ 、0.01)。与模型组比较, 独活醇提取物组小鼠肝组织病理损伤明显改善, 血清中 AST、ALT 活性显著降低 ($P < 0.01$), GSH 水平和 SOD 活性均显著升高 ($P < 0.01$ 、0.001), 肝组织 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.01$ 、0.001), 肝组织中 Nrf2/HO-1 和 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路相关蛋白表达显著下调 ($P < 0.05$ 、0.01)。 **结论** 独活醇提取物对 CCl₄ 所致小鼠急性肝损伤具有明显的保护作用, 其作用机制可能为通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路抗氧化损伤, 同时调控 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路减轻炎症反应, 从而发挥其保肝作用。

关键词: 独活; 急性肝损伤; 氧化应激; 炎症; 蛇床子素; 二氢欧山芹醇当归酸酯; Nrf2/HO-1 信号通路; TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)17-5867-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.17.013

Protective effect and mechanism of ethanol extract of *Angelicae Pubescentis Radix* on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice

WU Shihui¹, LONG Xiaoyun¹, ZHAO Hantao¹, YUAN Lyujia^{1,2}, CHEN Qianfeng^{1,2}

1. School of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

2. Engineering Research Center of the Ministry of Education for the Development and Utilization of *Coptis chinensis*, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Objective To study the protective effect and mechanism of ethanol extract of Duhuo (*Angelicae Pubescentis Radix*) against acute liver injury in mice induced by carbon tetrachloride (CCl₄). **Methods** A total of 60 male Kunming mice were randomly divided into control group, model group, silybin (63 mg/kg), ethanol extract of *Angelicae Pubescentis Radix* low-, medium- and high-dose (50, 150, 300 mg/kg) groups, with 10 mice in each group. Drugs were continuously administered for one week, acute liver injury was induced in mice by intraperitoneally injection of 0.2% CCl₄ solution 2 h after the final administration. After intraperitoneally injection

收稿日期: 2024-03-22

基金项目: 重庆市中医药重点建设学科 (2021-4322190044)

作者简介: 吴诗慧, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药化学。Email: wushihui83@163.com

*通信作者: 陈前鋒, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为天然药物化学。E-mail: cqf2011@swu.edu.cn

for 24 h, serum and liver tissue were collected. The activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), superoxide dismutase (SOD) and content of glutathione (GSH) in serum were detected by kits; The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and IL-1 β in liver tissue were detected by kits; Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes in liver tissue; Western blotting was used to detect the protein expressions of Toll-like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation factor 88 (MyD88), phosphorylated kappa B inhibitor protein kinase (p-IKK), phosphorylated kappa B alpha kinase (p-IkBa), phosphorylated nuclear factor- κ B p65 (p-p65), TNF- α , nuclear factor erythroid-derived factor 2-related factor (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) in liver tissue. **Results** Compared with control group, AST and ALT activities in serum of mice in model group were significantly increased ($P < 0.001$), GSH level and SOD activity were significantly decreased ($P < 0.01$), and the levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in liver tissue were significantly increased ($P < 0.001$), Nrf2/HO-1 and TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway related protein expressions in liver tissue were significantly up-regulated ($P < 0.05, 0.01$). Compared with model group, liver tissue pathological damage of mice in ethanol extract of *Angelicae Pubescentis Radix* group was significantly improved, AST and ALT activities in serum were significantly decreased ($P < 0.01$), GSH level and SOD activity were significantly increased ($P < 0.01, 0.001$), and the levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in liver tissue were significantly decreased ($P < 0.01, 0.001$), Nrf2/HO-1 and TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway related protein expressions in liver tissue were significantly down-regulated ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Ethanol extract of *Angelicae Pubescentis Radix* has a significant protective effect on CCl₄-induced acute liver injury in mice, and its mechanism may be activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway to resist oxidative damage, while regulating the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway to alleviate inflammatory response, thereby exerting its hepatoprotective effect.

Key words: *Angelicae Pubescentis Radix*; acute liver injury; oxidative stress; inflammation; osthole; columbianadin; Nrf2/HO-1 signaling pathway; TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway

肝脏是负责外源性代谢最重要的器官，是调节物质生物转化的敏感靶点^[1]。然而，在生物转化为低毒物质的过程中通过产生活性氧、形成活性代谢物和激活调节细胞死亡或存活信号转导通路等途径可能产生诱导肝脏损伤的分子^[2]。许多外源物如药物和环境化学物等能够引起一定程度的肝损伤^[3]。随着生活方式的改变，肝损伤已成为世界上最常见的疾病之一，其发病率和死亡率都很高，尤其是在发展中国家^[4]。中药作为治疗或预防外源性肝损伤的潜在药物，因其多靶点作用、低毒及不良反应少等优势受到越来越多的关注。

独活 *Angelicae Pubescentis Radix* 被收载于《中国药典》2020 年版，为伞形科植物重齿毛当归 *Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan et Yuan 的干燥根，具有祛风除湿、通痹止痛之功效^[5]，其作为一种常用的抗风湿镇痛药在我国用于治疗风湿病的关节痛和头痛已有近 2 000 年的历史。现代药理学研究表明，独活提取物具有神经保护、抗肿瘤、抗关节炎、抗炎和镇痛等作用^[6]。独活中含有的香豆素类化合物紫花前胡苷对脂多糖所致小鼠肝损伤显示出优于水飞蓟素的保护作用^[7]，但是独活对化学性肝损伤的保护作用尚不明确，本研究通过建立四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) 诱导的小鼠急性肝损伤模型，探讨独活对急性肝损伤的保肝作用和作用机制，为临床上治疗外源性肝损伤提供实

验基础和理论依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性昆明小鼠，8 周龄，购自重庆恩斯维尔生物科技有限公司，生产许可证号 SCXK (湘) 2019-0004，饲养于西南大学药学院动物实验中心，在恒温 21~23 ℃、恒湿 60%~70%，12 h 昼夜交替的环境下饲养，给予普通饲料，自由进食饮水。动物实验经西南大学动物实验伦理委员会批准 (批准号 IACUC-20201210-03)，所有程序均严格按照动物使用和护理的伦理原则进行。

1.2 药材

独活药材于 2019 年 3 月采于重庆市巫山县官阳镇，经西南大学药学院袁吕江教授鉴定为伞形科植物重齿毛当归 *A. pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan et Yuan 的干燥根，标本 (20190302) 存放于西南大学药学院。

1.3 药品与试剂

丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 测定试剂盒 (批号 ml095162)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 测定试剂盒 (批号 ml095194)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 测定试剂盒 (批号 ml095262)、过氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 测定试剂盒 (批号 ml092620)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor-

α , TNF- α) 测定试剂盒(批号 ml002095)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)测定试剂盒(批号 ml098430)、IL-1 β 测定试剂盒(批号 ml098416)均购自上海酶联股份有限公司;磷酸化 κ B 抑制蛋白激酶(phosphorylated kappa B inhibitor protein kinase, p-IKK)抗体(批号 ab302958)、核因子 E2 相关因子(nuclear factor erythroid-derived factor 2-related factor, Nrf2)抗体(批号 ab62352)、血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)抗体(批号 ab305290)来自上海艾博抗贸易有限公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 60004-1-Ig)、Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)抗体(批号 66350-1-Ig)、髓分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)抗体(批号 67969-1-Ig)、磷酸化 I κ B- α 抑制蛋白(phosphorylated kappa B alpha kinase, p-I κ B α)抗体(批号 51066-1-AP)、磷酸化核因子- κ B p65(phosphorylated nuclear factor- κ B p65, p-p65)抗体(批号 82335-1-RR)、TNF- α 抗体(批号 60291-1-Ig)、山羊抗兔 IgG 二抗(批号 PR30011)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;蛇床子素对照品(批号 JOT-10359, 质量分数 $\geq$ 98.0%)、二氢欧山芹醇当归酸酯对照品(批号 JOT-10327, 质量分数 $\geq$ 98.0%)均购自成都普菲德生物有限公司;水飞蓟宾(批号 S81788)购自上海麦克林生化科技股份有限公司;其他试剂为分析纯。

1.4 仪器

AL104 型电子天平(梅特勒托利有限公司); synergyH1 型酶标仪(基因有限公司); 164-5070 型通用电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); SCIENTZ-207A 型全自动匀浆机(新芝生物科技有限公司); LC-20A 型岛津高效液相色谱仪(日本岛津仪器有限公司); CX41RF 型光学显微镜(日本 Nikon 公司); GTR116C 型高速离心机(湖南可成仪器设备有限公司)。

2 方法

2.1 独活醇提物的制备

将独活药材粉碎为粗粉,取独活粉末 1.0 kg,加 10 倍量 75%乙醇回流提取 3 次,每次 2 h,合并醇提液,回收溶剂至无醇味并冷冻干燥,得到独活醇提物。

2.2 分组、造模与给药

小鼠适应性饲养 1 周后,随机分成对照组、模型组及独活醇提物低、中、高剂量(50、150、300

mg/kg)组和水飞蓟宾(63 mg/kg)组,每组 10 只。依据《中国药典》2020 年版中独活剂量(3~9 g)与实验动物与人的体表面积换算关系进行剂量换算。各给药组 ig 相应药物,对照组和模型组 ig 等体积 0.5%羧甲基纤维素钠,1 次/d,连续给药 1 周。末次给药 2 h 后,除对照组外,其他小鼠 ip 0.2% CCl₄ 溶液,禁食不禁水 24 h,眼眶静脉丛取血,收集血清和肝脏组织。

2.3 血清生化指标检测

全血室温静置 2 h 后,3 000 r/min 离心 15 min,分离血清,按照试剂盒说明书检测血清中 ALT、AST、SOD 活力和 GSH 含量。

2.4 肝脏中炎症指标检测

称取适量的肝组织,加入冰冷的生理盐水作为匀浆介质,在冰浴中制成 10%肝组织匀浆液,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,按照试剂盒说明书测定 TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 水平。

2.5 肝组织病理学观察

取固定于福尔马林的部分小鼠肝脏最大叶中央区域肝脏,进行石蜡包埋、切片、常规苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,然后将切片置于光学显微镜下观察肝组织病理变化。

2.6 Western blotting 检测肝组织中 Nrf2/HO-1 和 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路相关蛋白表达

肝脏组织采用蛋白提取试剂盒提取蛋白样本,BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经 12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,用含 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 1 h 后,分别加入以 1:8 000 稀释的一抗,以 GAPDH 作为内参,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗膜,将膜浸入以 1:10 000 稀释的二抗稀释液中,室温孵育 2 h。用 TBST 洗去过量的二抗后,进行曝光、显影,并用 Image J 软件进行条带的定量分析。

2.7 统计学分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Graphpad Prism 8.0 软件进行分析。多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组内两两比较采用学生 t 检验(student t test)。

3 结果

3.1 独活及其提取物的质量控制

《中国药典》2020 年版^[5]规定独活含蛇床子素(C₁₅H₁₆O₃)不得少于 0.50%,含二氢欧山芹醇当归酸酯(C₁₉H₂₀O₅)不得少于 0.080%。参照《中国药

典》2020 年版方法对本研究所用独活进行含量测定,测得蛇床子素质量分数为 1.48%,二氢欧山芹醇当归酸酯质量分数为 0.20%,符合《中国药典》2020 年版标准(图 1)。本研究制备了独活醇提取物用于小鼠体内药效研究,醇提取物提取率为 21%,独活醇提取物中含蛇床子素 12.69 mg/g、二氢欧山芹醇当归酸酯 1.46 mg/g。

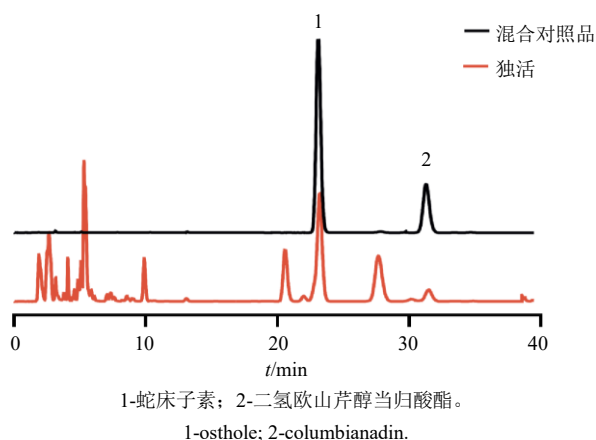
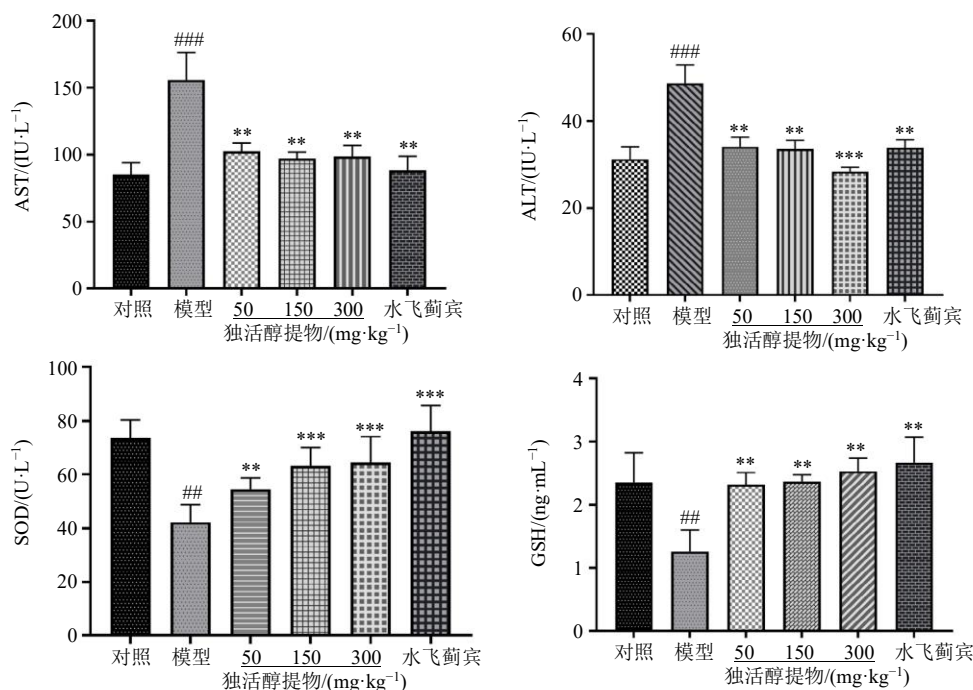


图 1 混合对照品及独活的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of mixed reference substances and *Angelicae Pubescentis Radix*



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同。

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 2 独活醇提取物对急性肝损伤小鼠血清中 ALT、AST、SOD 活性及 GSH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effect of ethanol extract of *Angelicae Pubescentis Radix* on activities of AST, ALT, SOD and level of GSH in serum of mice with acute liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.2 独活醇提取物对急性肝损伤小鼠血清中 ALT、AST、SOD 活性及 GSH 水平的影响

如图 2 所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中 ALT、AST 活性显著升高($P < 0.001$),表明 CCl_4 可引起小鼠肝脏转氨酶活性升高,显示出肝脏毒性。与模型组比较,各给药组小鼠血清中 ALT 和 AST 活性均显著降低($P < 0.01$ 、 0.001),表明独活醇提取物对 CCl_4 导致的小鼠肝损伤具有明显的保护作用。

与对照组比较,模型组小鼠血清中 GSH 水平和 SOD 活性明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠血清中 GSH 水平和 SOD 活性均显著升高($P < 0.01$ 、 0.001)。表明独活醇提取物能够通过抗氧化应激改善 CCl_4 导致的小鼠肝损伤。

3.3 独活醇提取物对急性肝损伤小鼠肝组织中炎症因子水平的影响

如图 3 所示,与对照组比较,模型组小鼠肝组织中 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、IL-1 β 水平明显升高($P < 0.001$),表明在肝损伤小鼠中产生了严重的肝脏炎症。与模型组比较,各给药组小鼠肝组织中 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、IL-1 β 水平均显著下降($P < 0.01$ 、 0.001),表明独活醇提取物能够改善急性肝损伤小鼠的肝脏炎症。

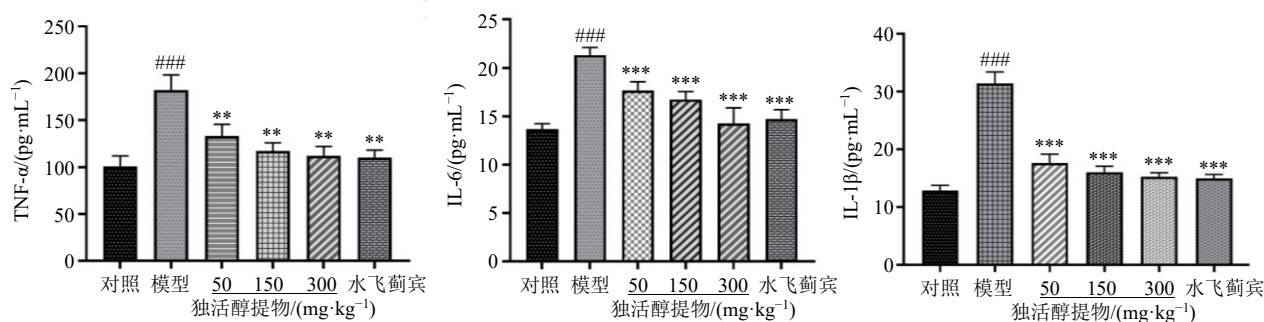


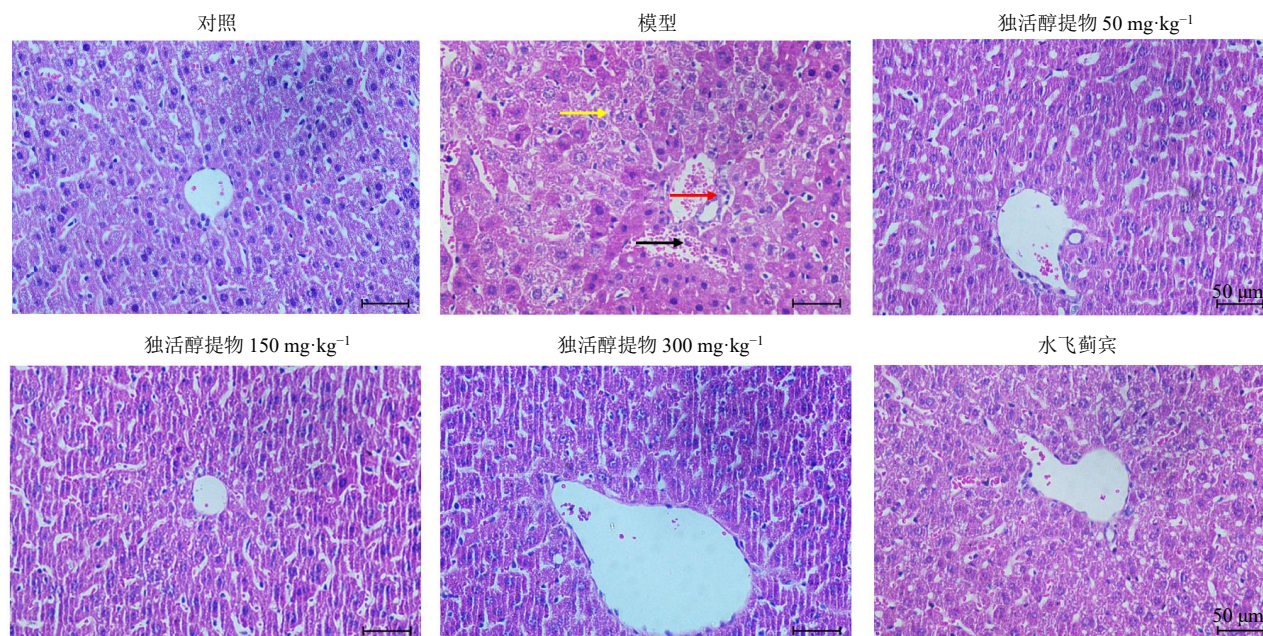
图 3 独活醇提取物对急性肝损伤小鼠肝组织中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Effect of ethanol extract of *Angelicae Pubescentis Radix* on levels of TNF-α, IL-6 and IL-1β in liver tissue of mice with acute liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.4 独活醇提取物对急性肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响

如图 4 所示，对照组小鼠肝细胞排列整齐，结构完整；模型组小鼠肝组织出现明显的细胞坏死、

中央静脉充血、炎性细胞浸润等病变；各给药组小鼠肝细胞坏死、瘀血状况及炎性细胞浸润均得到明显缓解，表明独活醇提取物能够改善 CCl₄ 所致小鼠肝损伤。



红色箭头表示炎症因子入侵；黑色箭头表示中央静脉充血；黄色箭头表示肝细胞坏死。

Red arrow indicates inflammatory factor infiltration; Black arrow indicates venous hyperemia; Yellow arrow indicates hepatocyte necrosis.

图 4 独活醇提取物对急性肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 4 Effect of ethanol extract of *Angelicae Pubescentis Radix* on pathological changes in liver tissue of mice with acute liver injury (HE, ×200)

3.5 独活醇提取物对急性肝损伤小鼠肝组织中 Nrf2/HO-1 和 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路相关蛋白表达的影响

如图 5-A 所示，与对照组比较，模型组小鼠肝组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，各给药组 Nrf2 和 HO-1 蛋白

表达水平均显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)。如图 5-B 所示，与对照组比较，模型组小鼠肝组织中 TLR4、MyD88、p-IKK、p-IκBα、p-p65、TNF-α 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01, 0.001$)；与模型组比较，各给药组 TLR4、MyD88、p-IKK、p-IκBα、p-p65、TNF-α 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。

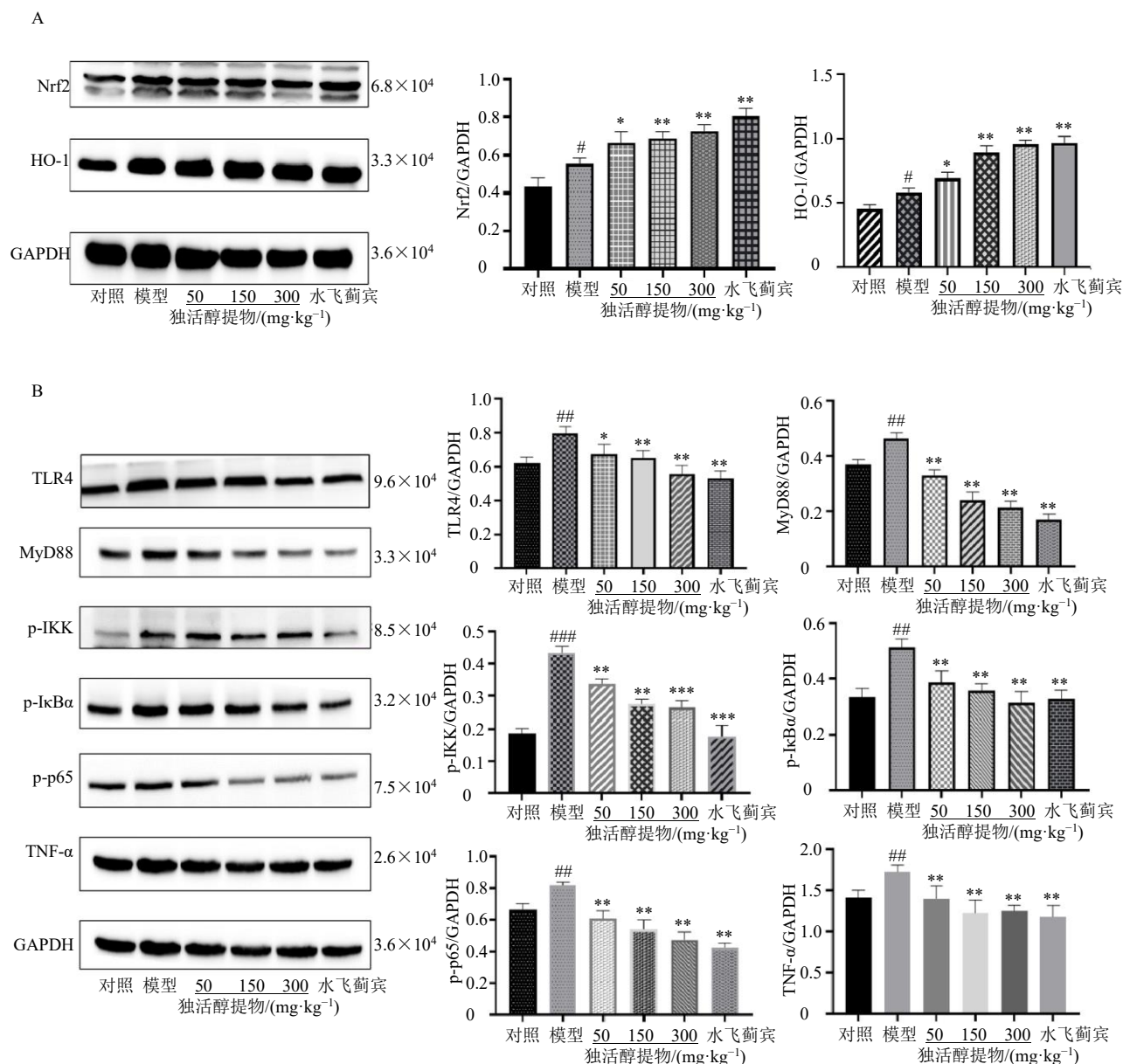


图 5 独活醇提取物对急性肝损伤小鼠肝组织中 Nrf2/HO-1 (A) 和 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路 (B) 相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of ethanol extract of *Angelicae Pubescentis Radix* on Nrf2/HO-1 (A) and TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway (B) related protein expressions in liver tissue of mice with acute liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

CCl_4 是一种能够产生化学性肝损伤的毒性化合物, 当其进入机体后, 途径肝脏时, 肝脏中的肝微粒体色素 P450E1 将 CCl_4 分解为三氯甲基自由基和三氯甲基衍生物等一系列有害物质, 最终可以导致肝细胞产生脂质过氧化和一系列炎症反应^[8]。 CCl_4 诱导的肝损伤是经典的实验性肝损伤动物模型, 其机制和原理更类似于人类药物性急性肝损伤, 可用于保肝药物的筛选、评价以及肝损伤的

机制研究^[9]。

在 CCl_4 致肝损伤的过程中肝细胞膜受损, 使其通透性增加, 让原本在细胞内的大量物质释放到血液中, 如代表性的活性物质 ALT 和 AST 在血液中的活性会显著升高, 因此 ALT 和 AST 可作为评判肝损伤严重程度的重要指标^[10]。独活中的香豆素类成分具有显著的抗炎、镇痛等作用^[11-12], 但对独活是否具有保肝作用未有探讨。本研究表明, 独活醇提取物能显著降低 CCl_4 诱导的急性肝损伤小鼠血清

ALT 和 AST 活性,并改善小鼠肝脏细胞坏死、内皮出血及炎性细胞浸润等病理状况。

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具有至关重要的作用,抑制氧化应激和炎症被认为是治疗肝损伤的重要策略^[13]。过度的氧化应激会导致内源性抗氧化剂的耗竭而引起肝损伤^[14]。SOD 和 GSH 是人体内主要清除自由基的抗氧化剂^[15],维持着机体的氧化还原平衡。氧自由基积累过多时肝脏受损,SOD 活性和 GSH 含量越低,肝损伤程度越严重^[16]。本研究结果显示,CCl₄所致肝损伤小鼠血清中 GSH 水平和 SOD 活性显著降低,而不同剂量的独活醇提物能通过调节机体抗氧化系统使其趋于正常,缓解肝损伤。

Nrf2 作为参与调节细胞抗氧化反应和氧化应激的转录因子,调控多种氧化还原平衡以及抗氧化蛋白的表达^[17-18]。HO-1 是 Nrf2 信号的下游蛋白,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^[19],对抑制氧化应激和维持细胞稳定状态至关重要^[19]。结果显示,模型组小鼠肝组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达显著高于对照组;与模型组比较,独活醇提物可提高 Nrf2 和下游蛋白 HO-1 的表达从而达到抗氧化的作用。

细胞膜受损裂解时,大量内容物释放出来,从而引发炎症反应^[20]。IL-1 β 和 TNF- α 是重要的炎症因子,参与炎症反应、细胞凋亡、氧化应激等过程,具有强烈的促炎活性^[21-23]。在 TNF- α 的刺激下白细胞不断加剧炎症反应^[24],吞噬细胞产生 IL-6,诱导趋化、胞吐和爆发,加剧促炎因子表达^[25]。在本研究中,模型组小鼠肝组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平明显升高,而独活醇提物明显抑制了炎症因子的产生,从而缓解炎症反应。

TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路主要介导炎症因子反应,与肝损伤密切相关^[26]。当机体受到外界刺激时,首先触发先天免疫,诱导 TLR4 表达,一些内源性配体通过激活 TLR4 受体,使 TLR4 表达增高,与 MyD88 进一步结合后,诱导 NF- κ B p65 从细胞质转移到细胞核,从而导致 TNF- α 、IL-1 β 等促炎因子的释放^[27],产生适应性免疫反应,初始炎症信号持续放大,从而产生所谓的炎症瀑布效应^[28-29]。当炎症发生时,I κ B 激酶蛋白的 IKK 磷酸化促进其降解,并与 NF- κ B 解离,NF- κ B 游离后易位到细胞核诱导炎症因子的转录和翻译^[30]。本研究中,独活醇提物显著抑制 TLR4、MyD88、TNF- α 、p-IKK、

p-I κ B α 、p-p65 的蛋白表达,表明独活醇提物可以激活 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路,通过调节下游细胞因子缓解 CCl₄ 引起的急性肝损伤,减轻炎症细胞浸润,从而使肝损伤得到明显改善。且独活醇提物的疗效与阳性对照药水飞蓟宾并无明显差异。

综上,独活醇提物对 CCl₄ 所致小鼠急性肝损伤具有明显的保护作用,其作用机制可能通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路抗氧化损伤,同时调控 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路减轻炎症反应,发挥其保肝作用。本研究为进一步探索独活保肝作用及拓展其临床应用提供了一定的实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Khalil W, Madkour F, Dessouki A. Protective effect of ethanol extract of *Sargassum dentifolium* (Phaeophyceae) in carbon tetrachloride-induced hepatitis in rats [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2012, 4(3): 637-641.
- [2] Rautou P E, Mansouri A, Lebrec D, et al. Autophagy in liver diseases [J]. *J Hepatol*, 2010, 53(6): 1123-1134.
- [3] Sturgill M G, Lambert G H. Xenobiotic-induced hepatotoxicity: Mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function [J]. *Clin Chem*, 1997, 43(8 Pt 2): 1512-1526.
- [4] Lau D T Y, Membreno F E. Antiviral therapy for treatment-naïve hepatitis B virus patients [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2004, 33(3): 581-599.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 274
- [6] Lu Y Q, Wu H W, Yu X K, et al. Traditional Chinese medicine of *Angelicae Pubescentis Radix*: A review of phytochemistry, pharmacology and pharmacokinetics [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 335.
- [7] Lim J Y, Lee J H, Yun D H, et al. Inhibitory effects of nodakenin on inflammation and cell death in lipopolysaccharide-induced liver injury mice [J]. *Phytomedicine*, 2021, 81: 153411.
- [8] 徐彭, 谈伟锋, 刘波, 等. 四氯化碳诱导的小鼠肝损伤模型比较 [J]. 江西中医药大学学报, 2014, 26(3): 66-69.
- [9] Lin Y C, Cheng K M, Huang H Y, et al. Hepatoprotective activity of Chhit-Chan-Than extract powder against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats [J]. *J Food Drug Anal*, 2014, 22(2): 220-229.
- [10] Xu N, Gao Z, Zhang J J, et al. Hepatoprotection of enzymatic-extractable mycelia zinc polysaccharides by *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis* [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 157: 196-206.

- [11] Li R L, Zhao C, Yao M N, *et al.* Analgesic effect of coumarins from *Radix Angelicae Pubescentis* is mediated by inflammatory factors and TRPV1 in a spared nerve injury model of neuropathic pain [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 195: 81-88.
- [12] Lu J Y, Fang K Y, Wang S J, *et al.* Anti-inflammatory effect of columbianetin on lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells [J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018: 9191743.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Victor V M, Rocha M, Esplugues J V, *et al.* Role of free radicals in sepsis: Antioxidant therapy [J]. *Curr Pharm Des*, 2005, 11(24): 3141-3158.
- [16] Kim S H, Yoon D, Lee Y H, *et al.* Transformation of liver cells by 3-methylcholanthrene potentiates oxidative stress via the downregulation of glutathione synthesis [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(6): 2011-2017.
- [17] Zhao L S, Tao X F, Qi Y, *et al.* Protective effect of dioscin against doxorubicin-induced cardiotoxicity via adjusting microRNA-140-5p-mediated myocardial oxidative stress [J]. *Redox Biol*, 2018, 16: 189-198.
- [18] Dasdelen D, Solmaz M, Menevse E, *et al.* Increased apoptosis, tumor necrosis factor- α , and DNA damage attenuated by 3',4'-dihydroxyflavonol in rats with brain ischemia-reperfusion [J]. *Indian J Pharmacol*, 2021, 53(1): 39-49.
- [19] Dolado I, Swat A, Ajenjo N, *et al.* p38 α MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2007, 11(2): 191-205.
- [20] He M H, Pan H, Chang R C, *et al.* Activation of the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway contributes to the protective effects of *Lycium barbarum* polysaccharides in the rodent retina after ischemia-reperfusion-induced damage [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e84800.
- [21] Zhao S, Chen W, Li W, *et al.* LncRNA TUG1 attenuates ischaemia-reperfusion-induced apoptosis of renal tubular epithelial cells by sponging miR-144-3p via targeting Nrf2 [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(20): 9767-9783.
- [22] Rong Z J, Huang Y L, Cai H H, *et al.* Gut microbiota disorders promote inflammation and aggravate spinal cord injury through the TLR4/MyD88 signaling pathway [J]. *Front Nutr*, 2021, 8: 702659.
- [23] Iwawaki T. From property of IL-1 β to imaging of inflammation [J]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 2017, 40(5): 329-336.
- [24] Chen T L, Zhang X D, Zhu G L, *et al.* Quercetin inhibits TNF- α induced HUVECs apoptosis and inflammation via downregulating NF- κ B and AP-1 signaling pathway *in vitro* [J]. *Medicine*, 2020, 99(38): e22241.
- [25] Martinou J C, Youle R J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics [J]. *Dev Cell*, 2011, 21(1): 92-101.
- [26] Liu M, Xu Y W, Han X, *et al.* Dioscin alleviates alcoholic liver fibrosis by attenuating hepatic stellate cell activation via the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 18038.
- [27] O'Neill L A J, Bowie A G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(5): 353-364.
- [28] Zhang X, Du Q M, Yang Y, *et al.* The protective effect of luteolin on myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury through TLR4/NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 91: 1042-1052.
- [29] Huang Z N, Zhuang X D, Xie C L, *et al.* Exogenous hydrogen sulfide attenuates high glucose-induced cardiotoxicity by inhibiting NLRP3 inflammasome activation by suppressing TLR4/NF- κ B pathway in H9c2 cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(6): 1578-1590.
- [30] Dixit V, Mak T W. NF- κ B signaling: Many roads lead to madrid [J]. *Cell*, 2002, 111(5): 615-619.

[责任编辑 李亚楠]