

基于 p62-Keap1-Nrf2 信号通路探讨荆防颗粒对酒精性肝损伤小鼠的保护作用

丁美灵^{1,2}, 高 铭^{1,2}, 包懿文^{1,2}, 雷紫琴^{1,2}, 杨金蓉³, 杨若聪^{1,2}, 程国良⁴, 张贵民^{4*}, 曾 南^{1,2*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

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

3. 成都中医药大学基础医学院, 四川 成都 611137

4. 鲁南制药集团股份有限公司经方与现代中药融合创新全国重点实验室, 山东 临沂 276005

摘要: 目的 基于 p62-Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)-核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 信号通路探讨荆防颗粒对酒精性肝损伤 (alcoholic liver injury, ALI) 小鼠氧化应激的保护作用及机制。方法 SPF 级 KM 小鼠按体重随机分为对照组、模型组、荆防颗粒高、低剂量 (15.0、10.5 g/kg) 组及 *N*-乙酰半胱氨酸 (*N*-acetylcysteine, NAC, 0.3 g/kg) 组, 除对照组外, 其余各组小鼠连续 ig 给药 15 d 并 ig 白酒构建 ALI 模型, 末次 ig 白酒 12 h 后处死小鼠, 收集血清及肝组织。采用苏木素-伊红 (HE) 染色、油红 O 染色和透射电镜观察肝组织病理形态变化; 采用全自动生化仪检测小鼠血清中天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 和丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 活性; 采用 ELISA 法和流式细胞术检测肝组织炎症因子和氧化应激水平; 采用免疫组化法检测小鼠肝组织细胞色素 P450 2E1 (cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1, CYP2E1) 表达; 采用 Western blotting 检测小鼠肝组织 CYP2E1、Nrf2、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase 1, HO-1)、超氧化物歧化酶 1 (superoxide dismutase 1, SOD1)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸醌脱氢酶 1 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate quinone oxidoreductase 1, NQO1)、p62、Keap1、微管相关蛋白 1 轻链 3B-II/I (microtubule-associated protein 1 light chain 3B-II/I, LC3B-II/I)、乙醇脱氢酶 1 (alcohol dehydrogenase 1, ADH1)、乙醛脱氢酶 2 (aldehyde dehydrogenase 2, ALDH2) 蛋白表达。结果 与模型组相比, 荆防颗粒高剂量组小鼠肝脏指数、血清 AST 及 ALT 活性显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 肝脏中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 肝组织中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 降低, 脂质过氧化产物丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平和 CYP2E1 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平明显降低 ($P < 0.05$); 肝脏脂肪堆积、肝组织炎性细胞浸润得到明显改善 ($P < 0.05$ 、 0.01), 肝细胞形态结构异常变化也得到缓解。荆防颗粒能显著上调 ALI 小鼠肝脏 ADH1、ALDH2、Nrf2、HO-1、NQO1、SOD1 和 LC3B-II/I 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 并下调 NOX4、p62 和 Keap1 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 荆防颗粒可通过激活 p62-Keap1-Nrf2 信号通路, 提高机体抗氧化能力并激活自噬来发挥抗 ALI 作用。

关键词: 荆防颗粒; 酒精性肝损伤; 氧化应激; 酒精代谢; p62-Keap1-Nrf2 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)19-6588-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.19.013

Jingfang Granules protects alcoholic liver injury in mice through regulating p62-Keap1-Nrf2 signaling pathway

DING Meiling^{1,2}, GAO Ming^{1,2}, BAO Yiwen^{1,2}, LEI Ziqin^{1,2}, YANG Jinrong³, YANG Rucong^{1,2}, CHENG Guoliang⁴, ZHANG Guimin⁴, ZENG Nan^{1,2}

1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine,

收稿日期: 2024-03-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074094); 2022 年度“天府青城计划”天府名师项目 (川青城第 1206 号)

作者简介: 丁美灵, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药理学与毒理学研究。Tel: 18315062390 E-mail: 2634609191@qq.com

*通信作者: 曾 南, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药理学与毒理学研究。Tel: 13198502352 E-mail: 19932015@cdutcm.edu.cn

张贵民, 男, 研究员, 主要从事药理学研究。E-mail: lunanzhangguimin@yeah.net

Chengdu 611137, China

3. College of Basic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

4. State Key Laboratory of Integration and Innovation of Classic Formula and Modern Chinese Medicine, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276005, China

Abstract: Objective To explore the protect effects of Jingfang Granules (荆防颗粒, JFGR) on oxidative stress in mice with alcoholic liver injury (ALI) and its mechanism related to p62- Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) - nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) signaling pathway. **Methods** According to body weight, KM mice were randomly divided into five groups of control group, model group, JFGR high-, low-dose (15.0, 10.5 g/kg) groups and *N*-acetylcysteine (NAC, 0.3 g/kg) group. Except control group, mice of other groups were intragastric administrated the corresponding drug and white wine every day for 15 d to establish the ALI model. The pathological changes of liver tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, oil red O staining and transmission electron microscopy. The activities of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in serum of mice were detected by automatic biochemical analyzer. The levels of liver inflammation and oxidative stress were detected by ELISA and flow cytometry. The expression of cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1 (CYP2E1) in liver was detected by immunohistochemistry. The protein expressions of CYP2E1, Nrf2, heme oxygenase 1 (HO-1), superoxide dismutase 1 (SOD1), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate quinone oxidoreductase 1 (NQO1), p62, Keap1, microtubule-associated protein 1 light chain 3B-II/I (LC3B-II/I), alcohol dehydrogenase 1 (ADH1) and aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) in liver were determined by Western blotting. **Results** Compared with model group, JFGR (15 g/kg) significantly decreased the liver index and the activities of AST, ALT in serum ($P < 0.05$, 0.01), significantly increased the levels of superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) and glutathione (GSH) in liver ($P < 0.05$, 0.01), reduced the level of reactive oxygen species (ROS), and significantly decreased malondialdehyde (MDA) level. CYP2E1 expression and the content of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in liver ($P < 0.05$). In addition, JFGR significantly decreased the liver fat accumulation and the hepatocyte inflammatory infiltration ($P < 0.05$, 0.01), and ameliorated the morphological and structural changes. JFGR significantly up-regulated the expression levels of ADH1, ALDH2, Nrf2, HO-1, NQO1, SOD1, LC3B-II/LC3B-I in liver ($P < 0.05$, 0.01), and inhibited the expressions of NOX4, p62, Keap1 proteins ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** JFGR could alleviate the alcohol-induced liver injury in mice, which the mechanism maybe related to activate p62-Keap1-Nrf2 signaling pathway so as to improve the antioxidant level and activate autophagy.

Key words: Jingfang Granules; alcoholic liver injury; oxidative stress; alcohol metabolism; p62-Keap1-Nrf2 signaling pathway

酒精性肝损伤 (alcoholic liver injury, ALI) 是一种长期大量饮酒导致的肝脏疾病。据统计, 全球约 20 亿人有饮酒习惯, 其中超过 7 500 万人被临床诊断为酒精使用障碍, 并面临着患酒精相关肝病的高风险^[1]。该病的典型病变为肝炎、肝脂肪变性及肝纤维化, 严重危及人类健康。ALI 的病理研究表明氧化应激是其主要发病机制之一, 酒精代谢过程中细胞色素 P450 2E1 (cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1, CYP2E1) 产生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 是发生氧化应激的主要原因^[2]。此外, 激活的 Kupffer 细胞通过还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases, NOX) 产生的 ROS 也会加重肝脏氧化应激^[3]。研究发现, 核因子 E2 相关因子 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 信号通路可参与改善氧化应激, 从而预防 ALI^[4-6]。Nrf2 是抗氧化反应的关键调节因

子^[7], 通常由 Kelch 样 ECH 相关蛋白 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 介导的蛋白酶体降解来维持其低水平状态, 但暴露于 ROS 中会使 Keap1 发生构象变化, 干扰 Nrf2 泛素化, 随后 Nrf2 被激活易位至细胞核, 诱导下游抗氧化相关蛋白的表达。p62 是一种泛素结合蛋白, 与细胞信号传导、氧化应激和自噬有关, 而自噬活化在激活 Nrf2 和预防 ALI 中亦充当重要角色^[8]。因此, Keap1-Nrf2 信号通路可能通过 p62 与自噬相互作用, 对 ALI 起到保护作用。

荆防颗粒是明代张时彻《摄生众妙方》中记载的荆防败毒散的现代中成药制剂, 临床主要用于治疗风寒感冒^[9]。课题组前期研究发现, 荆防颗粒具有解酒作用, 能加速机体酒精代谢和激活自噬^[10]。另有研究表明, 荆防颗粒中的欧前胡素^[11]、升麻素苷^[12]、柴胡皂苷^[13]、川芎嗪^[14]、橙皮苷^[15]、茯苓多糖^[16]、桔梗^[17]和甘草^[18-19]可缓解多种因素引

起的肝损伤;荆防颗粒对四氯化碳诱导的肝损伤有显著保护作用,还可通过增强肝脏抗氧化能力减轻小鼠急性酒精中毒^[20],提示荆防颗粒可能通过减轻氧化应激反应干预 ALI。考虑到 p62-Keap1-Nrf2 通路与氧化应激之间的紧密联系,本研究通过 ig 白酒建立 ALI 小鼠模型,探究荆防颗粒能否通过激活 p62-Keap1-Nrf2 通路减轻氧化应激,发挥对 ALI 的保护作用,为荆防颗粒的临床应用拓展提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 KM 小鼠 50 只,体质量(20±2)g,雌雄各半,由北京斯贝福生物技术有限公司提供,实验动物许可证号 SCXK(京)2019-0010,合格证号 110324220101188162,饲养于成都中医药大学药学院实验动物观察室,室温(25±1)℃,相对湿度(50±5)%,光照/黑暗周期为 12 h。本研究动物实验经成都中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号 20200320)。

1.2 药品与试剂

荆防颗粒(国药准字 Z37020357,批号 0012008009)由山东新时代药业有限公司提供;*N*-乙酰半胱氨酸(*N*-acetylcysteine, NAC,批号 824O033,质量分数≥98%)购自北京索莱宝生物科技有限公司;56° 红星二锅头(批号 20191204)购自北京红星股份有限公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(批号 091323231228)、过氧化氢酶(catalase transaminase, CAT)试剂盒(批号 071321220513)、丙二醛(malonydialdehyde, MDA)试剂盒(批号 090423231229)均购自上海碧云天生物科技有限公司;天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒(批号 105-000443-00)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒(批号 105-000442-00)均购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司;肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)试剂盒(批号 WZ07FDX42365)均购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司;CYP2E1 抗体(批号 133042)、NOX4 抗体(批号 132932)、血红素氧合酶-1(heme oxygenase, HO-1)抗体(批号 132798)均购自江苏亲科生物研究中心有限公司;乙醇脱氢酶 1(alcohol dehydrogenase 1, ADH1)抗体(批号 5295S)、p62 抗体(批号 23214S)、Keap1 抗体(批

号 8047S)、微管相关蛋白 1 轻链 3B(microtubule-associated protein 1 light chain 3B, LC3B)抗体(批号 12742F)均购自美国 CST 公司;乙醛脱氢酶 2(acetaldehyde dehydrogenase 2, ALDH2)抗体(批号 323861)、Nrf2 抗体(批号 323881)均购自上海艾比玛特医药科技有限公司;超氧化物歧化酶 1(superoxide dismutase 1, SOD1)抗体(批号 sc-101523)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸醌脱氢酶 1(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate quinone oxidoreductase 1, NQO1)抗体(批号 sc-376023)均购自上海 Santa Cruz Animal Health 公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 AC2111013A)、 β -actin 抗体(批号 AC220227008)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号 BST17G08A17H54)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗(批号 BST18F26C18J50)均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 仪器

UPK-10T 型纯水仪(广州优普有限责任公司);JCS 型电子天平(惠州英衡电器有限公司);DS-H 200 型水平摇床(武汉赛维尔生物科技有限公司);Varioskan Flash 全波长多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);TSJ-II 型脱水机(常州市中威电子仪器有限公司);BMJ-III 型包埋机(常州郊区中威电子仪器厂);EM UC7 型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);Pannoramic 250 型病理切片扫描仪(匈牙利 3DHISTECH Kft 公司);NIKON DS-U3 型成像系统(日本尼康公司);BS-240VET 型动物血液生化测定仪(深圳 Mindray 公司);JEM-1400 FLASH 型透射电子显微镜(日本 JEOL 公司);cytoflex 型流式分析仪(美国 Beckman 公司);BA210 型 Digital 数码三目摄像显微镜(厦门麦克奥迪实业集团有限公司);ChemiDoc 免染型化学发光凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

小鼠适应性饲养 3 d 后,按体质量随机分为对照组、模型组和荆防颗粒高、低剂量(15.0、10.5 g/kg,分别为 60 kg 成人临床等效剂量的 2、1.4 倍)组和 NAC(0.3 g/kg)组,每组 10 只,雌雄各半。对照组和模型组小鼠连续 15 d ig 等体积生理盐水,其余各组小鼠 ig 对应药物(20 mL/kg),每日给药 1 h

后,除对照组外,其余组小鼠 ig 56° 红星二锅头白酒 (14 mL/kg),对照组 ig 等体积生理盐水。末次 ig 红星二锅头白酒 12 h 后,ip 1%戊巴比妥钠 (10 mL/kg) 麻醉,取材备用。病理形态学和相关指标检测主要观察荆防颗粒有效剂量组即高剂量 (15 g/kg) 组结果。

2.2 肝脏指数检测

取肝组织称定质量并计算肝脏指数。
肝脏指数=肝质量/体质量

2.3 肝组织病理学观察

取小鼠肝脏相同部位固定于 10%中性甲醛溶液中,不同体积分数乙醇脱水处理,二甲苯洗脱、包埋、石蜡切片。石蜡切片进行苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 和油红 O 染色。使用全自动数字切片扫描仪捕获和扫描染色区域,观察小鼠肝组织病理学变化。HE 染色结果统计各病理改变程度分数总和^[21-22],病理改变程度见表 1。油红 O 染色结果以组织细胞中脂滴呈橘红色,核呈蓝色为阳性表达,采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统分析 (美国 Media Cybernetics 公司)。

脂滴相对面积=脂滴表达面积/视野面积

表 1 病理改变程度

Table 1 Degree of pathological change

病理改变程度	无病变/分	轻度/分	中度/分	重度/分
肝细胞体积增大且肿胀	0	1	2	3
肝细胞变性引起空泡化	0	1	2	3
肝细胞坏死	0	1	2	3
炎性细胞浸润	0	1	2	3

2.4 血清生化指标检测

小鼠麻醉后从眼眶取全血,室温静置 1 h,4 ℃、3 000 r/min 离心 15 min,取上清液,按试剂盒说明书检测血清中 AST 和 ALT 活性。

2.5 肝组织抗氧化因子、炎症因子水平及 ROS 含量检测

称取小鼠肝组织 10~15 mg,按试剂盒说明书加入提取液,低温进行组织研磨,制成 10%组织匀浆,离心,取上清液,按试剂盒说明书检测肝组织中 MDA、SOD、GSH、CAT、TNF-α 水平;将肝组织制成细胞悬液,200 目细胞筛滤过,红细胞裂解液裂解,按照 1:1 000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA,每管加入 1 mL DCFH-DA 稀释液,37 ℃ 孵育 20 min,离心,弃上清,洗涤细胞 3 次。阳性对照

管在装载好探针后,用无血清培养基按照 1:1 000 的比例配制 Rosup 稀释液,于管中加入 1 mL Rosup 稀释液,37 ℃ 孵育 30 min,洗涤 3 次,离心,弃上清。加入 PBS 重悬,用流式细胞仪检测 ROS 水平,以平均荧光强度为评价指标,采用 CytExper 软件对结果进行分析。

2.6 肝组织 CYP2E1 表达检测

将肝组织石蜡切片与 3%过氧化氢孵育 10 min,以阻断内源性过氧化物酶,PBS 洗涤后滴加山羊血清封闭液,室温孵育 20 min。滴加 CYP2E1 一抗,4 ℃ 孵育过夜;PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;滴加二抗,37 ℃ 孵育 30 min;PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。滴加过氧化氢和 DAB 进行显色,于显微镜下观察并拍照。

2.7 透射电子显微镜观察细胞结构

将肝组织切成 1~3 mm 的小块,浸入预先配制的 2.5%戊二醛固定液中固定 48 h,并用 1%四氧化锇再固定 2 h。取出组织进行特异性包埋和染色。透射电镜观察肝组织细胞结构、亚细胞结构的形态变化。

2.8 Western blotting 检测小鼠肝组织相关蛋白表达水平

采用 RIPA 裂解液提取小鼠肝组织总蛋白 (组织质量:裂解液 1:10),经 BCA 法测定蛋白含量,加上样缓冲液,95 ℃ 水浴煮 5 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,经 5%脱脂奶粉封闭 1.5 h 后,分别加入一抗孵育过夜 (ADH1、CYP2E1、NOX4、SOD1、Nrf2、HO-1 及 NQO1 抗体稀释度比例为 1:1 000,ALDH2、LC3B、p62、Keap1 及内参 GAPDH、β-actin 抗体稀释比例为 1:2 000)。次日取出,TBST 洗涤 5 次后,加入二抗 (1:5 000) 孵育 1.5 h,TBST 洗涤 5 次,用 ECL 化学发光显色液显色曝光,采用 Image Lab 6.0.1 软件进行分析。

2.9 统计学分析

使用 SPSS 26 软件对数据进行统计分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,若符合正态分布,采用单因素方差分析或 *T* 检验;不符合正态分布则采用非参数检验;计数数据采用等级资料的非参数检验。

3 结果

3.1 荆防颗粒对 ALI 小鼠肝脏指数及肝功能的影响
如表 2 所示,与对照组比较,模型组小鼠肝脏

表 2 荆防颗粒对 ALI 小鼠肝脏指数及肝功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 2 Effects of Jingfang Granules on liver index and liver function of ALI mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肝脏指数/(mg·g ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)
对照	—	3.84±0.29	188.59±23.89	45.99±7.55
模型	—	5.03±0.48 ^{###}	361.22±98.85 ^{###}	88.14±28.81 ^{##}
荆防颗粒	15.0	4.48±0.12 [*]	248.73±41.99 [*]	46.97±13.76 ^{**}
	10.5	4.51±0.30	286.72±52.16	59.49±15.77
NAC	0.3	4.50±0.08	271.19±42.58	52.49±9.92 [*]

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$, 下表同。
[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group, same as below tables.

指数、血清中 AST 和 ALT 活性均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), 提示造模成功。与模型组比较, NAC 组 ALI 小鼠血清 ALT 活性显著降低 ($P < 0.05$), 荆防颗粒高剂量组小鼠肝脏指数、血清中 AST 与 ALT 活性均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 实验结果提示荆防颗粒能减轻 ALI 小鼠肝细胞损伤, 从而其发挥保肝作用。

3.2 荆防颗粒对 ALI 小鼠肝脏病理学变化及炎症因子水平的影响

如图 1 和表 3 所示, 对照组小鼠肝脏组织被膜完整, 肝小叶分叶不明显, 肝窦结构正常, 未见明显瘀血扩张及炎性浸润, 门管区小叶间动脉、小叶

间静脉及小叶间胆管结构较为完整, 周围未见明显纤维组织增生和炎性细胞浸润; 模型组小鼠肝脏组织可见少量炎性细胞浸润, 以核圆深染的淋巴细胞和杆状分叶核的中性粒细胞为主, 同时出现肝细胞坏死以及肝细胞空泡变性, 说明肝脏损伤严重 ($P < 0.001$), 提示造模成功; 荆防颗粒高剂量组未见显著肝细胞坏死及炎性细胞浸润表现, 提示荆防颗粒能改善酒精诱导的肝脏组织结构损伤 ($P < 0.05$), 具有保肝作用。与对照组相比, 模型组小鼠肝脏组织中 TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 荆防颗粒高剂量组小鼠肝脏组织中 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05$)。

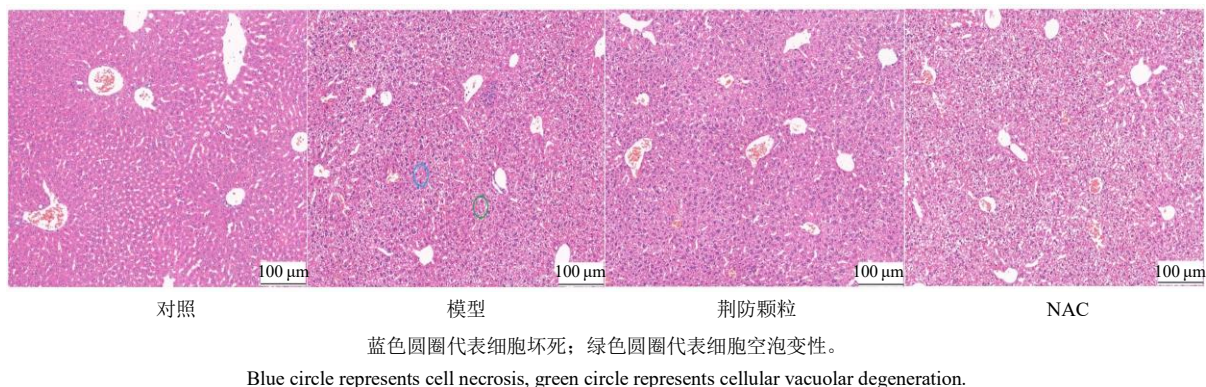


图 1 荆防颗粒对 ALI 小鼠肝脏组织病理变化的影响 ($\times 100$; $\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 7$)

Fig. 1 Effect of Jingfang Granules on liver histopathological changes in ALI mice ($\times 100$; $\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 7$)

表 3 荆防颗粒对 ALI 小鼠肝脏组织病理变化及炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 7$)

Table 3 Effects of Jingfang Granules on histopathological changes and level of inflammatory factor in liver of ALI mice ($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 7$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	病理评分	TNF- α /(pg·mg ⁻¹)
对照	—	1.33±0.52	797.20±144.66
模型	—	5.00±0.00 ^{###}	963.55±15.39 [#]
荆防颗粒	15.0	3.17±0.41 [*]	821.57±59.40 [*]
NAC	0.3	4.00±1.00	829.45±87.40 [*]

3.3 荆防颗粒对 ALI 小鼠肝脏脂质堆积的影响

如图 2 和表 4 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠肝组织红色区域明显, 脂滴相对面积显著提高, 提示造模成功 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 荆防颗粒组脂滴相对面积显著降低 ($P < 0.01$), 表明荆防颗粒可有效改善酒精诱导的肝脏脂质积累, 发挥保肝作用。

3.4 荆防颗粒对 ALI 小鼠肝脏酒精代谢酶表达的影响

如图 3 和表 5 所示, 与对照组相比, 模型组小

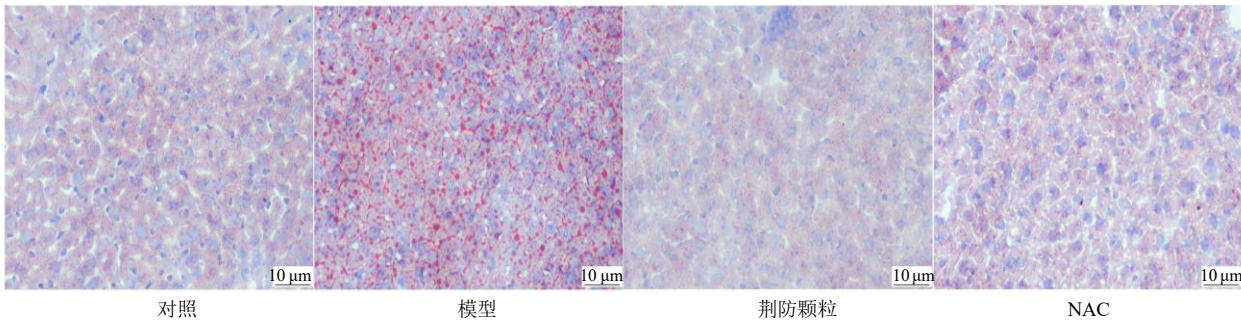


图 2 荆防颗粒对 ALI 小鼠肝脏脂质积累的影响 (×400; $\bar{x} \pm s, n = 3 \sim 4$)

Fig. 2 Effect of Jingfang Granules on hepatic lipid accumulation in ALI mice (×400; $\bar{x} \pm s, n = 3 \sim 4$)

表 4 荆防颗粒对 ALI 小鼠肝脏脂质积累的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3 \sim 4$)

Table 4 Effect of Jingfang Granules on hepatic lipid accumulation in ALI mice ($\bar{x} \pm s, n = 3 \sim 4$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	脂滴相对面积/%
对照	—	0.23±0.04
模型	—	7.72±5.35 ^{##}
荆防颗粒	15.0	0.47±0.39 ^{**}
NAC	0.3	3.69±2.37

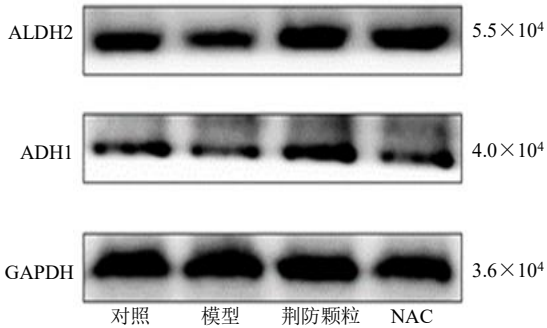


图 3 荆防颗粒对 ALI 小鼠肝组织 ADH1、ALDH2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Effects of Jingfang Granules on ADH1 and ALDH2 protein expressions in liver of ALI mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

表 5 荆防颗粒对 ALI 小鼠肝组织 ADH1、ALDH2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 5 Effect of Jingfang Granules on ADH1 and ALDH2 protein expressions in liver of ALI mice
($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量	
		ADH1	ALDH2
对照	—	1.00±0.00	1.00±0.00
模型	—	0.65±0.16 [#]	0.68±0.18 [#]
荆防颗粒	15.0	1.23±0.23 ^{**}	1.18±0.15 ^{**}
NAC	0.3	1.11±0.42 [*]	1.17±0.36 ^{**}

鼠肝组织 ADH1、ALDH2 蛋白表达水平显著下调 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 荆防颗粒能显著上调 ADH1、ALDH2 表达水平 ($P < 0.01$), 提示荆防颗

粒可加速酒精在肝脏中的代谢, 发挥 ALI 保护作用。

3.5 荆防颗粒对 ALI 小鼠肝脏抗氧化能力的影响

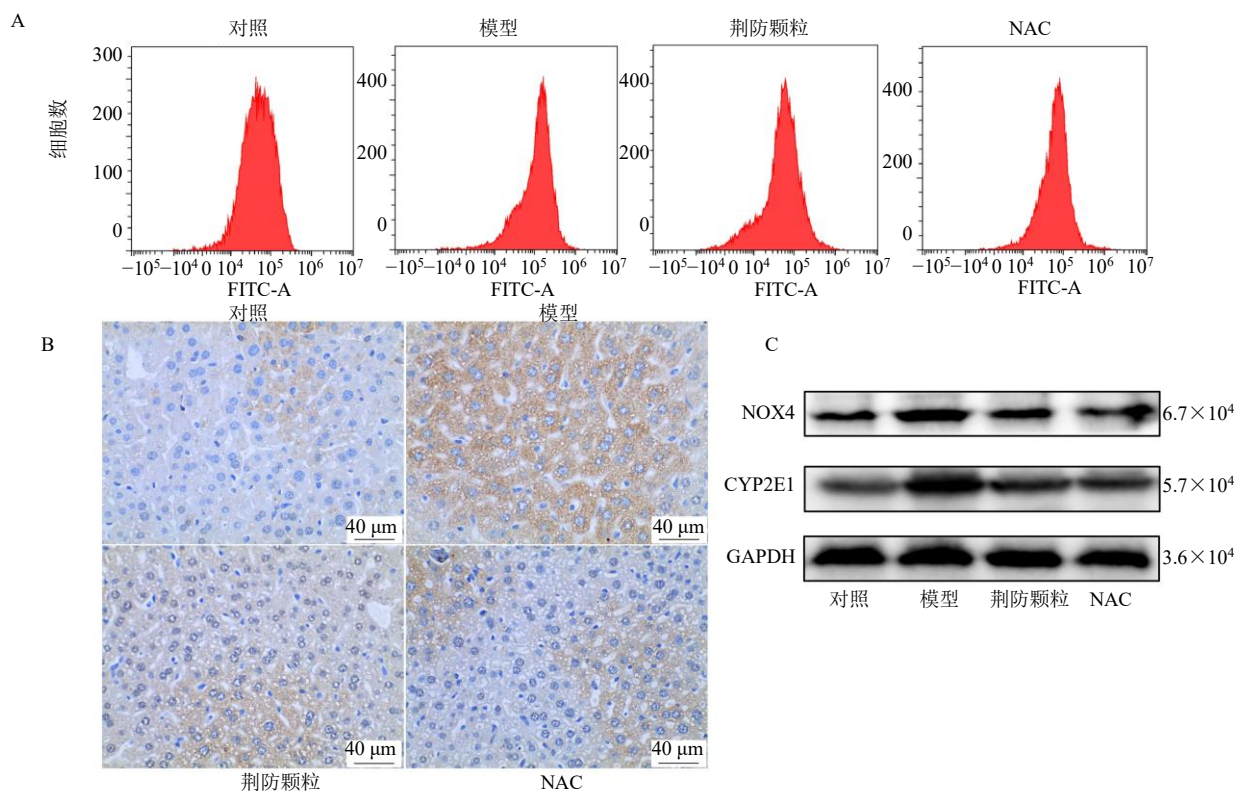
如图 4 和表 6 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠肝组织抗氧化物质 SOD、CAT、GSH 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 同时脂质过氧化产物 MDA 水平显著增加 ($P < 0.01$); 模型组小鼠肝组织 ROS 平均荧光强度及氧化应激蛋白 CYP2E1、NOX4 表达水平显著增加 ($P < 0.05$ 、0.01)。与模型组相比, 荆防颗粒能显著升高 SOD、CAT、GSH 水平 ($P < 0.05$ 、0.01), 同时明显逆转 MDA 的积累 ($P < 0.05$), 并减少肝脏 ROS 水平, 下调 CYP2E1 与 NOX4 表达水平 ($P < 0.01$)。以上结果表明荆防颗粒能通过缓解过量饮酒诱导的氧化应激, 发挥 ALI 保护作用。

3.6 荆防颗粒对 ALI 小鼠肝脏 Nrf2、HO-1、SOD1、NQO1 蛋白表达的影响

如图 5 和表 7 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠肝组织 Nrf2、HO-1、SOD1、NQO1 蛋白表达水平均显著下调 ($P < 0.05$ 、0.001)。与模型组相比, 荆防颗粒能显著上调 Nrf2、HO-1、SOD1、NQO1 表达水平 ($P < 0.05$ 、0.01), 提示荆防颗粒可通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路, 提高机体抗氧化能力, 保护肝脏免受酒精诱导的氧化损伤。

3.7 荆防颗粒对 ALI 小鼠肝脏自噬的影响

如图 6-A 所示, 模型组小鼠肝细胞形态结构发生改变, 部分线粒体有轻度缩, 嵴密度升高, 但粗面内质网未病变扩张且胞质内有少量自噬小体 (双层膜或多层膜的泡状结构, 内含胞质成分); 而荆防颗粒组与 NAC 组小鼠肝细胞形态结构较正常, 细胞器完整清晰, 线粒体外膜连续完整, 嵴排列整齐紧密, 基质电子密度均匀, 均可见少量自噬小体和自噬溶酶体 (单层膜的泡状结构, 胞质成分已降解)。如图 6-B 和表 8 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠肝组织 p62、Keap1 蛋白表达水平显著升高 ($P <$



A-流式细胞术检测肝组织中 ROS 的水平; B-免疫组化检测肝组织中 CYP2E1 的表达 (×40); C-Western blotting 检测肝组织中 CYP2E1、NOX4 的蛋白表达。

A-flow cytometry detection of hepatic ROS level; B-immunohistochemical detection of hepatic CYP2E1 expression (×40); C-Western blotting detection of hepatic CYP2E1 and NOX4 expressions.

图 4 荆防颗粒对 ALI 小鼠肝脏抗氧化能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4 \sim 6$)

Fig. 4 Effect of Jingfang Granules on liver antioxidant capacity of ALI mice ($\bar{x} \pm s, n = 4 \sim 6$)

表 6 荆防颗粒对 ALI 小鼠肝脏抗氧化能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4 \sim 6$)

Table 6 Effect of Jingfang Granules on liver antioxidant capacity of ALI mice ($\bar{x} \pm s, n = 4 \sim 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	CAT/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	GSH/(μmol·g ⁻¹)
对照	—	31.19 ± 2.07	0.18 ± 0.03	104.16 ± 4.53	23.29 ± 4.25
模型	—	25.17 ± 4.54 ^{##}	0.30 ± 0.09 ^{##}	84.55 ± 15.32 [#]	16.73 ± 1.68 [#]
荆防颗粒	15.0	29.71 ± 2.00 [*]	0.21 ± 0.08 [*]	142.83 ± 36.15 ^{**}	23.43 ± 6.48 [*]
NAC	0.3	29.55 ± 1.09 [*]	0.22 ± 0.06 [*]	106.60 ± 29.01 [*]	28.42 ± 4.19 ^{***}
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ROS 平均荧光强度 (×10 ⁴)	CYP2E1 蛋白相对表达量	NOX4 蛋白相对表达量	
对照	—	6.49 ± 2.14	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	
模型	—	13.38 ± 3.86 [#]	1.73 ± 0.40 ^{##}	2.73 ± 0.42 ^{##}	
荆防颗粒	15.0	9.85 ± 2.00	0.95 ± 0.47 ^{**}	1.17 ± 0.47 ^{**}	
NAC	0.3	9.59 ± 1.34	0.72 ± 0.32 ^{***}	1.33 ± 0.47 [*]	

0.05、0.01), LC3B-II/I蛋白表达水平无显著性差异; 与模型组相比, 荆防颗粒能显著降低 p62、Keap1 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、0.001), 并显著上调 LC3B-II/I蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。表明荆防颗粒可激活自噬同时促进自噬小体降解, 发挥肝脏保护作用。

4 讨论

ALI 属于中医学中“酒胀”“酒疸”“伤酒”“胁痛”“酒鼓”等范畴。中医认为酒气剽悍而有大有毒,

酒毒伤及脾胃, 壅塞中焦, 酿痰生湿, 继而肝气不畅, 成肝郁之证^[23]。荆防颗粒是经方荆防败毒散的现代中药制剂, 由荆芥、防风、羌活、独活、柴胡、川芎、桔梗、前胡、枳壳、茯苓、甘草 11 味中药组成, 具有发汗解表、散风祛湿之功效^[9]。

目前对荆防颗粒药理作用的研究多集中在抗炎、调节免疫系统、抗病毒、解酒等方面^[24]。基于前期荆防颗粒具有良好解酒作用的研究结果^[10], 本

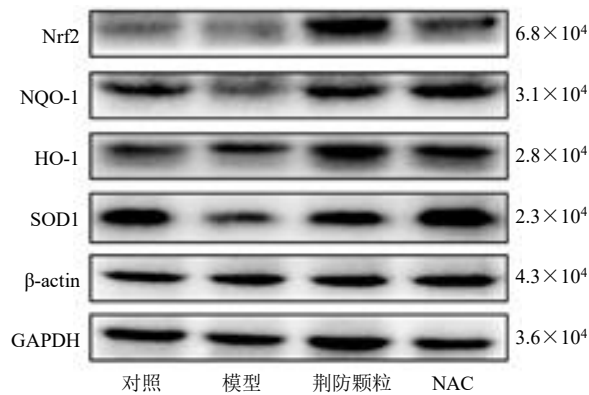


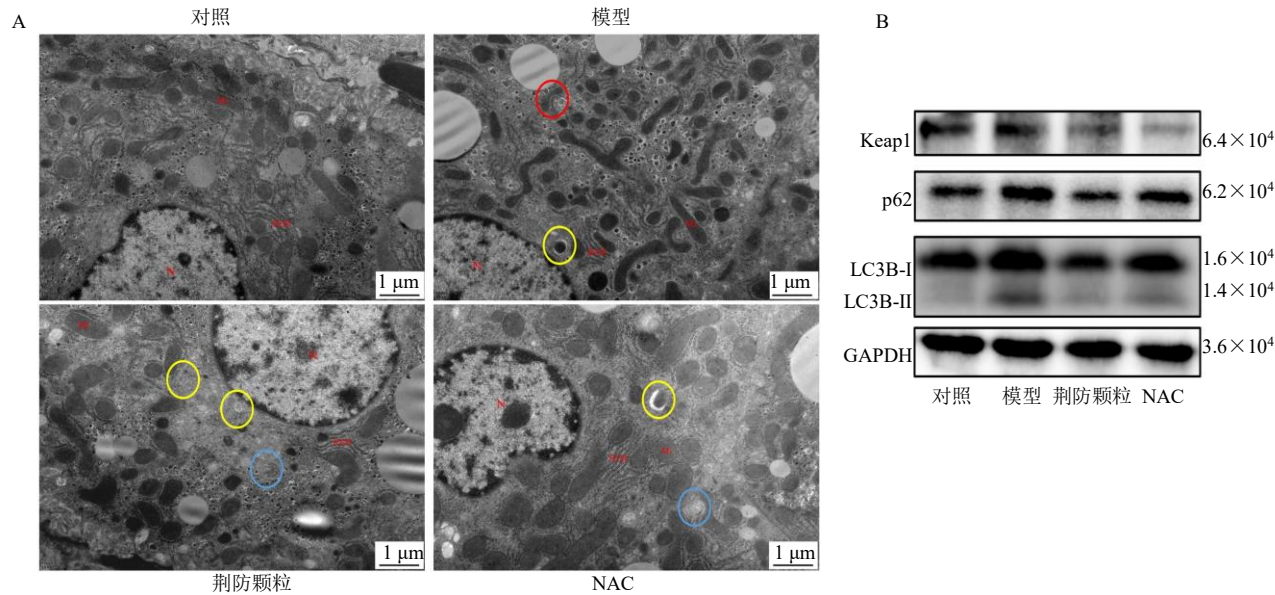
图 5 荆防颗粒对 ALI 小鼠肝脏 Nrf2、NQO1、HO-1、SOD1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4 \sim 6$)
Fig. 5 Effect of Jingfang Granules on expressions of Nrf2, NQO1, HO-1 and SOD1 proteins in liver of ALI mice ($\bar{x} \pm s, n = 4 \sim 6$)

研究通过构建 ALI 模型观察荆防颗粒的保肝作用，并以抗氧化剂 NAC 作为阳性对照，旨在探究荆防颗粒抗 ALI 的作用机制。

目前，已有多种动物模型用于研究短期和长期饮酒对酒精性肝病发生、发展的影响，常见造模方法有慢性自由摄入乙醇 (Lieber-DeCarli) [25]、慢性酒精喂养加急性酒精灌胃 (NIAAA) [26]、胃管强制连续灌注 (Tsukamoto-French) [27]、ig 白酒或 50% 乙醇等。本课题采用小鼠 ig 白酒法建立 ALI 模型，实验结果发现模型组小鼠肝脏指数增加，血清 AST、ALT 活性升高，肝脏脂肪堆积，肝细胞形态结构改变，提示造模成功。此外，模型组小鼠肝组织 ROS、MDA 水平升高，GSH、CAT、SOD 水平降低，呈现氧化应激状态；且模型组小鼠肝组织

表 7 荆防颗粒对 ALI 小鼠肝脏 Nrf2、NQO1、HO-1、SOD1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4 \sim 6$)
Table 7 Effect of Jingfang Granules on expression of Nrf2, NQO1, HO-1 and SOD1 proteins in liver of ALI mice ($\bar{x} \pm s, n = 4 \sim 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量			
		Nrf2	NQO1	HO-1	SOD1
对照	—	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型	—	0.51 ± 0.04 ^{###}	0.34 ± 0.10 ^{###}	0.49 ± 0.11 [#]	0.54 ± 0.03 [#]
荆防颗粒	15.0	1.68 ± 0.67 ^{**}	0.75 ± 0.28 [*]	1.21 ± 0.50 ^{**}	1.09 ± 0.44 [*]
NAC	0.3	1.30 ± 0.33 ^{**}	0.82 ± 0.20 ^{**}	1.22 ± 0.45 ^{**}	1.16 ± 0.54 [*]



A-透射电镜结果 ($\times 6\ 000$), 红色圆圈代表线粒体固缩, 黄色圆圈代表自噬小体, 蓝色圆圈代表自噬溶酶体; B-Western blotting 检测肝组织中 p62、Keap1、LC3B-II/I 的蛋白表达。
A-results of transmission electron microscopy ($\times 6\ 000$), red circle represents mitochondrial shrinkage, yellow circles represent autophagosomes, and blue circles represent autophagolysosomes; B-Western blotting detection of hepatic Keap1, p62, LC3B-II/I expressions.

图 6 荆防颗粒对 ALI 小鼠肝组织自噬的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4 \sim 6$)
Fig. 6 Effect of Jingfang Granules on autophagy in ALI mice ($\bar{x} \pm s, n = 4 \sim 6$)

表 8 荆防颗粒对 ALI 小鼠肝脏 LC3B-II/I、p62、Keap1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4 \sim 6$)

Table 8 Effect of Jingfang Granules on expressions of LC3B-II/I, p62 and Keap1 proteins in liver of ALI mice

($\bar{x} \pm s, n = 4 \sim 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量		
		LC3B-II/I	p62	Keap1
空白	—	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型	—	1.02 ± 0.37	1.98 ± 0.68 ^{##}	1.47 ± 0.19 [#]
荆防颗粒	15.0	2.01 ± 0.23 [*]	1.11 ± 0.34 [*]	0.84 ± 0.22 ^{***}
NAC	0.3	1.15 ± 0.47	1.01 ± 0.52 [*]	0.88 ± 0.34 [*]

TNF- α 炎症因子水平升高、肝组织炎性细胞浸润,表现出炎症病理状态。荆防颗粒干预后能明显改善 ALI 小鼠上述指标的异常变化,同时发现荆防颗粒能下调肝组织 CYP2E1 和 NOX4 的蛋白表达水平,表明荆防颗粒可通过增强抗氧化能力、抑制炎症反应来发挥保肝作用。此外,亦发现荆防颗粒能增加肝组织酒精代谢酶 ADH1、ALDH2 蛋白表达,从而加强酒精代谢减轻肝损伤。

研究表明 Nrf2 的激活对缓解 CYP2E1 诱导的氧化应激至关重要^[28]。Nrf2 激活剂萝卜硫素可通过刺激 Nrf2 核易位有效缓解慢性肝损伤,防止 CYP2E1 依赖性饮酒诱导的肝脂肪变性^[29]。HO-1 是 Nrf2 的下游抗氧化效应蛋白之一,也是 ALI 中抗氧化应激的保护因子,它可降低 CYP2E1 活性,减少 ROS 的产生^[30]。Keap1 是 Kelch 家族的一种阻遏蛋白,可与 Nrf2 结合维持其低活性^[31]。p62 通过与 Nrf2 竞争其与 Keap1 的结合,激活 Nrf2,是 Nrf2 非经典激活途径。在乙醇诱导的肝损伤中,已观察到 p62、Keap1 与 Nrf2 之间的串扰,二氢杨梅素可通过显著上调 p62 蛋白表达,促进 p62-Nrf2 正反馈环路以减轻肝损伤^[32]。本研究结果显示,荆防颗粒能显著对抗 ALI 小鼠肝组织 Nrf2 蛋白表达降低,增加 HO-1、SOD1 及 NQO1 抗氧化蛋白的表达,表明 Nrf2 参与了荆防颗粒的保肝过程。

自噬主要形式为细胞内容物和细胞器等被内质网来源的双膜包绕形成自噬体吞噬,与溶酶体融合后降解,以实现细胞本身代谢需求和细胞器更新,从而使细胞存活^[33]。因此,自噬失活导致变性蛋白和受损细胞器的过量积累,可引起肝损伤、糖尿病等^[34]。本研究通过透射电镜观察肝组织亚细胞结构,发现模型组能观察到自噬小体,但未发现自噬溶酶体,而荆防颗粒高剂量组小鼠肝脏可观察到自噬小体、自噬溶酶体增加的情况。LC3B 是自噬启动的关键蛋白,其含量与自噬程度呈正相关^[35]。自

噬发生时,p62 与泛素化蛋白结合,一同在自噬溶酶体内降解。因此,p62 蛋白水平与自噬呈负相关^[36]。p62 作为一种多域蛋白,能与许多蛋白结合,其中就包括 Keap1^[8]。通过进一步检测肝组织 LC3B、p62 及 Keap1 蛋白表达,发现模型组小鼠 LC3B-II/I 未变化,而 p62、Keap1 显著积累,提示模型组小鼠自噬降解受阻。与模型组比较,荆防颗粒能显著上调 LC3B-II/I 表达,降低 p62、Keap1 蛋白表达,表明荆防颗粒激活自噬的同时还促进自噬小体降解,与透射电镜检测结果一致。有文献报道,氧化应激过度时会导致 Nrf2 通路激活受阻,相关抗氧化反应蛋白表达受到抑制^[37]。在 ALI 模型中过度的氧化应激使 Nrf2 激活失调,蛋白表达结果也发现 Nrf2 及其下游抗氧化蛋白被显著抑制,而荆防颗粒则可对抗 Nrf2 信号通路的失调,呈现出良好抗氧化作用。本研究中由于荆防颗粒促进了自噬溶酶体降解,所以观察到 p62 蛋白表达降低,被 p62 整合进入自噬溶酶体的 Keap1 蛋白表达也显著下调;此外,荆防颗粒还通过激活 Nrf2 信号通路,增强抗氧化酶活性来抑制过度氧化应激(图 7)。

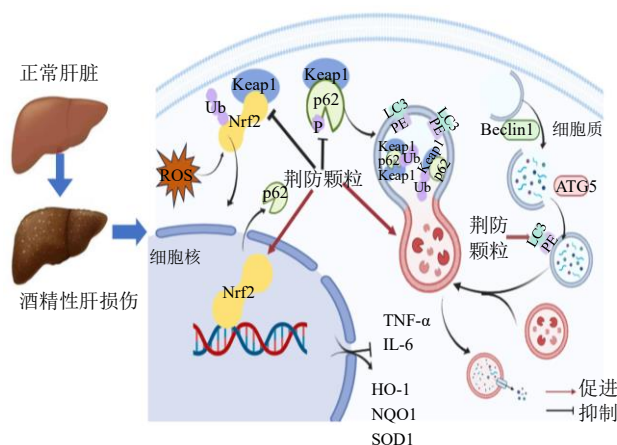


图 7 荆防颗粒对 ALI 小鼠肝脏保护作用机制

Fig. 7 Protective mechanism of Jingfang Granules on liver of ALI mice

综上,荆防颗粒可以通过 Nrf2 非经典激活途径串联自噬,激活 p62-Keap1-Nrf2 信号通路发挥对 ALI 的保护作用。然而,本研究仅选用了 1 种动物模型进行研究,且因小鼠个体差异性,部分结果标准差较大。因此,为进一步明确该药对 ALI 的保护作用,增强结果的可靠性,还需要在多种模型中进行验证。此外,机制研究方面,可以在现有研究的基础上进行更深入的探讨,并探究荆防颗粒对 ALI 的保护作用是否与自噬、氧化应激以外的其他通路有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Asrani S K, Devarbhavi H, Eaton J, *et al.* Burden of liver diseases in the world [J]. *J Hepatol*, 2019, 70(1): 151-171.
- [2] Lu Y K, Cederbaum A I. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol [J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 44(5): 723-738.
- [3] Wheeler M D, Kono H, Yin M, *et al.* The role of Kupffer cell oxidant production in early ethanol-induced liver disease [J]. *Free Radic Biol Med*, 2001, 31(12): 1544-1549.
- [4] Nagappan A, Kim J H, Jung D Y, *et al.* Cryptotanshinone from the *Salvia miltiorrhiza* Bunge attenuates ethanol-induced liver injury by activation of AMPK/SIRT1 and Nrf2 signaling pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1): 265.
- [5] Sun J, Hong Z X, Shao S, *et al.* Liver-specific Nrf2 deficiency accelerates ethanol-induced lethality and hepatic injury *in vivo* [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 426: 115617.
- [6] Xu L, Yu Y F, Sang R, *et al.* Protective effects of taraxasterol against ethanol-induced liver injury by regulating CYP2E1/Nrf2/HO-1 and NF- κ B signaling pathways in mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 8284107.
- [7] Ma Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013, 53: 401-426.
- [8] Qian H, Chao X J, Williams J, *et al.* Autophagy in liver diseases: A review [J]. *Mol Aspects Med*, 2021, 82: 100973.
- [9] 朱新红.荆防败毒散临床运用拾零 [J]. 浙江中医杂志, 2018, 53(7): 533.
- [10] 高铭, 张霞, 罗戴民, 等. 荆防颗粒对急性醉酒模型小鼠的解酒作用及作用机制 [J]. 中草药, 2023, 54(4): 1164-1172.
- [11] Gao Z, Zhang J C, Wei L, *et al.* The protective effects of imperatorin on acetaminophen overdose-induced acute liver injury [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 8026838.
- [12] Liu L L, Yan X, Xue K Y, *et al.* Prim-O-glucosycimifugin attenuates liver injury in septic mice by inhibiting NLRP3 inflammasome/caspase-1 signaling cascades in macrophages [J]. *Phytomedicine*, 2022, 106: 154427.
- [13] Chang G R, Lin W L, Lin T C, *et al.* The ameliorative effects of saikosaponin in thioacetamide-induced liver injury and non-alcoholic fatty liver disease in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11383.
- [14] Li Y J, Liu R P, Ding M N, *et al.* Tetramethylpyrazine prevents liver fibrotic injury in mice by targeting hepatocyte-derived and mitochondrial DNA-enriched extracellular vesicles [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(8): 2026-2041.
- [15] Li J D, Wang T Q, Liu P P, *et al.* Hesperetin ameliorates hepatic oxidative stress and inflammation via the PI3K/AKT-Nrf2-ARE pathway in oleic acid-induced HepG2 cells and a rat model of high-fat diet-induced NAFLD [J]. *Food Funct*, 2021, 12(9): 3898-3918.
- [16] Ye H X, Ma S Y, Qiu Z T, *et al.* *Poria cocos* polysaccharides rescue pyroptosis-driven gut vascular barrier disruption in order to alleviates non-alcoholic steatohepatitis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 296: 115457.
- [17] Ke W X, Wang P, Wang X H, *et al.* Dietary *Platycodon grandiflorus* attenuates hepatic insulin resistance and oxidative stress in high-fat-diet induced non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Nutrients*, 2020, 12(2): 480.
- [18] Zhang E X, Yin S T, Zhao S, *et al.* Protective effects of glycycomarin on liver diseases [J]. *Phytother Res*, 2020, 34(6): 1191-1197.
- [19] Liou C J, Lee Y K, Ting N C, *et al.* Protective effects of licochalcone A ameliorates obesity and non-alcoholic fatty liver disease via promotion of the sirt-1/AMPK pathway in mice fed a high-fat diet [J]. *Cells*, 2019, 8(5): 447.
- [20] 童妍, 李锐, 吴晓青. 荆防败毒散加减对急性酒精中毒小鼠的解酒作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 221-223.
- [21] National Toxicology Program. NTP toxicology and carcinogenesis studies of pyridine (CAS No. 110-86-1) in F344/N rats, Wistar rats, and B6C3F1 mice (drinking water studies) [J]. *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*, 2000, 470: 1-330.
- [22] National Toxicology Program. NTP toxicology and carcinogenesis studies of 4-methylimidazole (CAS No. 822-36-6) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies) [J]. *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*, 2007, 535: 1-276.
- [23] 于成文, 卢秉久. 中医药辨证治疗酒精性肝病浅析 [J]. 实用中医内科杂志, 2011, 25(2): 60.
- [24] 高铭, 丁美灵, 雷紫琴, 等. 荆防败毒散及其中成药制

- 剂研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2023, 39(5): 112-118.
- [25] Guo F F, Zheng K, Benedé-Ubieto R, *et al.* The lieber-DeCarli diet-a flagship model for experimental alcoholic liver disease [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2018, 42(10): 1828-1840.
- [26] Bertola A, Mathews S, Ki S H, *et al.* Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model) [J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(3): 627-637.
- [27] Brandon-Warner E, Schrum L W, Schmidt C M, *et al.* Rodent models of alcoholic liver disease: Of mice and men [J]. *Alcohol*, 2012, 46(8): 715-725.
- [28] Tong K I, Padmanabhan B, Kobayashi A, *et al.* Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(21): 7511-7521.
- [29] Zhou R, Lin J J, Wu D F. Sulforaphane induces Nrf2 and protects against CYP2E1-dependent binge alcohol-induced liver steatosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(1): 209-218.
- [30] Gong P F, Cederbaum A I, Nieto N. Heme oxygenase-1 protects HepG2 cells against cytochrome P450 2E1-dependent toxicity [J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 36(3): 307-318.
- [31] Gao B F, Doan A, Hybertson B M. The clinical potential of influencing Nrf2 signaling in degenerative and immunological disorders [J]. *Clin Pharmacol*, 2014, 6: 19-34.
- [32] Qiu P, Dong Y, Li B, *et al.* Dihydromyricetin modulates p62 and autophagy crosstalk with the Keap-1/Nrf2 pathway to alleviate ethanol-induced hepatic injury [J]. *Toxicol Lett*, 2017, 274: 31-41.
- [33] Mizushima N, Levine B, Cuervo A M, *et al.* Autophagy fights disease through cellular self-digestion [J]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1069-1075.
- [34] Komatsu M, Waguri S, Ueno T, *et al.* Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice [J]. *J Cell Biol*, 2005, 169(3): 425-434.
- [35] 武岳, 于卉影. 自噬对持续性正加速度暴露大鼠 Beclin-1、LC3-II 表达水平及学习记忆、行为能力影响研究 [J]. 临床军医杂志, 2020, 48(2): 137-140.
- [36] Lippai M, Löw P. The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 832704.
- [37] Ichimura Y, Waguri S, Sou Y S, *et al.* Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy [J]. *Mol cell*, 2013, 51(5): 618-631.

[责任编辑 罗 曦]