

原儿茶醛对环磷酰胺所致急性肝损伤的保护作用及机制研究

杨世瑜¹, 高思齐¹, 肖雨¹, 何继江¹, 邱昌龙², 李沙¹, 齐亚娟¹, 李继安², 储金秀^{1*}

1. 华北理工大学基础医学院, 河北省慢性疾病基础医学重点实验室, 河北 唐山 063210

2. 华北理工大学中医学院, 河北省中西医结合防治糖尿病及其并发症重点实验室, 河北 唐山 063210

摘要: 目的 探讨原儿茶醛 (protocatechuic aldehyde, PCA) 对环磷酰胺 (cyclophosphamide, CPA) 所致急性肝损伤的预防作用及其机制。方法 分别以 PCA (15、30 mg/kg) 和甘草酸二铵 (diammonium glycyrrhizinate, DG, 67.5 mg/kg) ig 小鼠, 1 次/d, 连续 14 d 后, ip CPA (200 mg/kg) 建立急性肝损伤小鼠模型, 第 2 天收集小鼠血清和肝脏组织; 采用生化法检测小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 水平以及肝脏组织匀浆中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平; 采用苏木素-伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染色观察各组小鼠肝组织病理变化; TUNEL 染色检测小鼠肝脏细胞凋亡情况; 采用超氧阴离子荧光探针检测小鼠肝细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的表达情况; 采用免疫组织化学染色检测小鼠肝细胞中核因子-E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 的易位情况; 采用蛋白质免疫印迹法检测小鼠肝组织凋亡淋巴瘤-2 (B cell lymphoma 2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cysteine containing cysteinyl aspartate-3, Caspase-3) 的表达, 及氧化应激相关蛋白 Kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)、Nrf2、血红素加氧酶 (heme oxygenase, HO-1)、谷氨酸-半胱氨酸连接酶催化亚基 (glutamate - cysteine ligase catalytic subunit, GCLC)、谷氨酸-半胱氨酸连接酶调节亚基 (glutamate-cysteine ligase modifier subunit, GCLM)、醌氧化还原酶 1 [NAD(P)H quinone oxidoreductase 1, NQO1] 的表达情况。结果 PCA 可以增加肝脏指数, 降低血清 ALT 和 AST 水平, 减少肝组织的细胞间隙和细胞肿胀, 呈剂量相关性地减轻 CPA 诱导的肝损伤 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); PCA 能明显降低肝组织 TUNEL 荧光染色强度 ($P < 0.005$)。此外, 蛋白质免疫印迹结果显示, PCA 可以增加 Bcl2 的表达 ($P < 0.001$), 降低 cleaved-Caspase3 和 Bax 的表达 ($P < 0.05$ 、 0.001), 表明 PCA 可以有效抑制肝细胞凋亡。氧化应激指标测定结果显示, PCA 提高了肝脏 SOD、CAT 和 GSH-PX 酶活性 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 降低了 ROS 和 MDA 水平 ($P < 0.01$ 、 0.001)。此外, PCA 还能显著降低 Keap1 的表达 ($P < 0.01$ 、 0.001), 引起 Nrf2 的核易位, 并增加 Nrf2 及下游抗氧化蛋白的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 PCA 可以预防 CPA 所致急性肝损伤, 其作用机制可能与抑制氧化应激和细胞凋亡有关。

关键词: 原儿茶醛; 肝损伤; 环磷酰胺; 氧化应激; 细胞凋亡; Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)22-7714-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.22.015

Prophylactic effect and mechanism of protocatechuic aldehyde on cyclophosphamide-induced acute liver injury

YANG Shiyu¹, GAO Siqu¹, XIAO Yu¹, HE Jijiang¹, QIU Changlong², LI Sha¹, QI Yajuan¹, LI Ji'an², CHU Jinxiu¹

1. Hebei Key Laboratory for Chronic Diseases, School of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

2. Hebei Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Diabetes Mellitus and Its Complications, School of Traditional Chinese Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

收稿日期: 2024-08-23

基金项目: 河北省自然科学基金中医药联合基金重点项目 (H2023209038); 河北省自然科学基金中医药联合基金重点项目 (H2022209087); 河北省高等学校科学技术研究项目 (ZD2022141)

作者简介: 杨世瑜 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药理。E-mail: ayu9728@163.com

*通信作者: 储金秀, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药理研究。E-mail: chujinxiu@126.com

Abstract: Objective To explore the prophylactic effect and mechanism of protocatechuic aldehyde (PCA) against cyclophosphamide (CPA)-induced acute liver injury. **Methods** Mice were orally treated with PCA at dosages of 15, 30 mg/kg or diammonium glycyrrhizinate (DG) at 67.5 mg/kg once daily for 14 days, followed by a single intraperitoneal injection of CPA at 200 mg/kg to establish an acute liver injury model. The serum and liver tissue were collected on the next day. The levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in mice serum and superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and malondialdehyde (MDA) in liver tissue homogenate were detected by biochemical kit. Hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of liver tissue. The apoptosis of liver cells was detected by dUTP nickel end-labeled fluorescent staining (TUNEL) mediated by terminal deoxynucleotide transferase. The expression of reactive oxygen species (ROS) in hepatocytes was detected by superoxide anion fluorescence staining. Immunohistochemical staining was used to detect the translocation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) in mouse hepatocytes. Western blotting was adopted to detect the protein expression of B cell lymphocyte 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), cysteine containing cysteinyl aspartate-3 (Caspase-3), Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), Nrf2, heme oxygenase-1 (HO-1), glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC), glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCLM) and NAD(P)H quinone oxidoreductase (NQO1). **Results** PCA could increase liver index, decrease serum ALT and AST levels, reduce cell space and cell swelling in liver tissue, and alleviate CPA-induced liver injury in a dose-dependent manner ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). PCA significantly decreased the intensity of TUNEL fluorescence staining ($P < 0.001$). In addition, western blotting results showed that PCA could increase the expression of Bcl-2 ($P < 0.001$) and decrease the expression of cleaved Caspase-3 and Bax ($P < 0.05, 0.001$), indicating that PCA could effectively inhibit hepatocyte apoptosis. The results of oxidative stress index showed that PCA increased the levels of SOD, CAT and GSH-Px ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and decreased the levels of ROS and MDA ($P < 0.01, 0.001$). It is worth noting that PCA could decreased Keap1 expression ($P < 0.01, 0.001$), induce nuclear translocation of Nrf2 and increase the expression of Nrf2 and downstream antioxidant proteins ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** PCA could prevent CPA-induced acute liver injury, which might be attributed to inhibiting oxidative stress and apoptosis. **Key words:** protocatechuic aldehyde; liver injury; cyclophosphamide; oxidative stress; cell apoptosis; Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathway

环磷酰胺 (cyclophosphamide, CPA) 是临床上常用的免疫抑制剂和抗癌药物, 肝脏是 CPA 激活和代谢的主要部位, 也是其毒性作用的靶器官^[1-2], 极大地限制了其临床应用和治疗效果^[3]。CPA 可通过诱导氧化应激和细胞凋亡引起肝损伤。因此, 常通过腹腔注射 CPA 建立急性肝损伤模型来评价药物的保肝作用^[4]。CPA 通过诱导肝脏产生过量的活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 干扰肝脏抗氧化防御系统的作用, 从而抑制肝脏抗氧化能力, 诱导氧化应激^[5]。氧化应激是影响细胞凋亡的重要因素之一。过量的 ROS 可以抑制抗凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 (B cell lymphoma 2, Bcl-2) 的表达, 上调促凋亡蛋白 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax) 的表达, 导致线粒体膜通透性增加, 细胞色素 C 从线粒体释放到细胞质中, 激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cysteine containing cysteinyl aspartate-3, Caspase-3), 诱导细胞凋亡^[6-7]。

核因子-E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 是发挥抗氧化功能的关键因子之一。当细胞受到氧化应激刺激时, Nrf2 从 Kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated

protein 1, Keap1) 中分离出来, 进入细胞核, 与受体和抗氧化反应元件结合, 促进下游抗氧化因子的释放, 从而抑制氧化应激。研究表明, 多种药物均可通过调节 Keap1/Nrf2 信号通路蛋白及下游抗氧化因子的表达来减轻急性肝损伤^[8-10]。

原儿茶醛 (protocatechuic aldehyde, PCA) 是酚酸类化合物的代表, 主要存在于多种药用植物中, 具有活血化瘀的作用, 还具有清除自由基、抗氧化^[11]、抗炎、抑制血小板聚集^[12]及抑制细胞凋亡^[13]等多种药理作用。此外, 复方丹参护肝颗粒对脂肪肝、酒精性的化学性肝损伤及慢性肝炎等肝损伤具有防治作用, 而 PCA 便是其中鉴定出的主要化合物之一^[14]。含有 PCA 成分的黄酮类化合物也可能通过激活 Nrf2/血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 信号通路, 改善脂多糖/D-半乳糖胺诱导的急性肝损伤^[15]。另有研究表明, PCA 能抑制四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠肝星状细胞的增殖^[16]。据此, 本研究推测 PCA 具有良好的保肝作用, 采用 PCA 预先干预, 再利用 CPA 建立小鼠急性肝损伤模型, 观察 PCA 对急性肝损伤的预防作用, 并从抗氧化应激和细胞凋亡的角度探讨其可能机制, 以期对肝损伤的

防治提供新的思路,为 PCA 的临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

40 只雄性 SPF 级 KM 小鼠,7 周龄,体质量 26~30 g,购自北京斯贝福生物科技有限公司,动物许可证号 SYXK(冀)2020-007。动物饲养于华北理工大学实验动物中心,室温 25℃、湿度 40%~60%、12 h 昼夜循环的环境中,饲养期间动物自由摄食和饮水。本研究动物实验方案经华北理工大学实验动物福利伦理委员会批准(批准号 2023SY029)。

1.2 药品和试剂

PCA(批号 S30203,质量分数 99.9%)购自上海源叶生物技术有限公司;CPA(批号 04200501)购自山西普德药业股份有限公司;甘草酸二铵(diammonium glycyrrhizinate, DG, 国药准字 H20040628,批号 10921110)购自江苏正大天晴药业有限公司;丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)生化试剂盒(批号 G1237W48、G1236W48、G0101W48、G0105W、G0204W48、G0109W48)均购自厦门仑昌硕生物科技有限公司;苏木素-伊红(hematoxylin eosin, HE)染色试剂盒(批号 G1120)购自北京索莱宝生物技术有限公司;DHE 探针(批号 S0063)、TUNEL 试剂盒(批号 C1086)购自上海碧云天生物技术有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒(批号 ZJ101)购自上海雅酶生物科技有限公司;含 DAPI 的抗淬灭封片剂(批号 C1211)购自中国北京普利莱基因科技有限公司。一抗 Caspase-3、cleaved-Caspase-3、Bcl-2、Bax 和 HRP 标记山羊抗兔二抗(批号 AF6311、AF7022、AF6139、AF0120 和 S0001)均购自美国 Affinity 公司。一抗 Keap1、Nrf2、HO-1、谷氨酸-半胱氨酸连接酶催化亚基(glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, GCLC)、谷氨酸-半胱氨酸连接酶调节亚基(glutamate-cysteine ligase modifier subunit, GCLM)、醌氧化还原酶 1[NAD(P)H quinone oxidoreductase, NQO1]和 β -actin 抗体(批号 R26935、R380773、R24541、R24419、

R382192、R381695 和 380624)均购自成都正能生物技术有限公司。

1.3 仪器

LX-165T2R 型高速冷冻离心机(青岛海尔生物医疗有限公司);M200Pro 型酶标仪(瑞士 TECAN 公司);BX53 型正置显微镜(美国 OLYMPUS 公司);MILLMIX20 型研磨珠均质器(欧洲 DOMEL 公司);SCZ2+型电泳/电转设备(北京君意东方电泳设备有限公司);ChemiDoc XRS+型化学发光成像仪(美国 BIO-RAD 公司);SK-O180-E 型圆周摇床(美国 Scilogex 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

普通维持饲料适应性喂养 1 周后,将 40 只小鼠随机分为对照组、模型组和 PCA 低、高剂量(15、30 mg/kg)^[17]组及 DG(67.5 mg/kg)组,每组 8 只。各给药组小鼠分别 ig 相应药物(20 mL/kg),对照组和模型组小鼠 ig 等体积生理盐水,1 次/d,连续 14 d。末次给药 1 h 后,除对照组外,其余组小鼠均 ip CPA(200 mg/kg)诱导急性肝损伤小鼠模型^[18-19]。小鼠禁食 12 h 后,称体质量,麻醉,腹主动脉采血。血液静置 2 h 后,3 000 r/min、4℃离心 15 min,取上清。剖取小鼠肝脏并称重,计算肝脏指数。将小鼠肝脏一部分固定于 4%多聚甲醛,另一部分储存于-80℃冰箱,用于后续实验。

肝脏指数=肝脏质量/体质量

2.2 生化指标检测

根据试剂盒说明书,采用酶标仪检测各组小鼠血清中 ALT 和 AST 水平。取小鼠肝脏组织用预冷生理盐水按 1:9(g/mL)的比例混匀制备肝脏匀浆,3 000 r/min、4℃离心 10 min,取上清。根据试剂盒说明书,用酶标仪检测各组小鼠肝脏组织中 SOD、GSH-Px、CAT 和 MDA 水平。

2.3 HE 染色法观察肝脏组织病理变化

取多聚甲醛中固定的小鼠肝脏组织,流水冲洗过夜。经梯度脱水、蜡浸、石蜡包埋后制备厚度为 4 μ m 的切片,进行 HE 染色。石蜡切片密封,自然干燥,于光学显微镜下观察肝组织病理损伤并拍照。

2.4 TUNEL 染色观察肝脏组织病理变化

石蜡切片用二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水, PBS 缓冲液洗涤,滴加 20 μ g/mL 不含 DNase 的蛋白酶 K,37℃孵育 30 min 后, PBS 彻底清洗切片,滴加 TUNEL 染液,37℃孵育 1 h,经 DAPI 染色后封

片,于荧光显微镜下观察并拍照分析。

2.5 超氧阴离子染色观察超氧阴离子表达

采用超氧阴离子探针 DHE 测定肝细胞中 ROS 水平。将肝组织制成 5 μm 厚度的冰冻切片, PBS 缓冲液洗涤,再滴入 1:1 000 的超氧阴离子工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h, PBS 缓冲液洗涤至少 40 min,最后用 DAPI 染色后封片,在荧光显微镜下观察超氧阴离子的表达,取 200 $\times$ 图像,通过荧光强度分析肝细胞内活性氧表达。

2.6 免疫组织化学法检测肝脏组织相关蛋白表达

内源性过氧化物酶抑制剂滴加到修复后的石蜡切片中孵育,后每个切片加入 Nrf2 抗体(稀释比为 1:100),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。第 2 天加入酶标二抗,室温孵育 2 h,然后加入适量新鲜制备的 DAB 显影剂。用苏木精液染色细胞核,用 1% 盐酸-乙醇分化液分化 5 s,蒸馏水冲洗数分钟恢复蓝色。用中性树脂密封后,在显微镜下观察并拍照分析。

2.7 Western blotting 检测肝脏组织相关蛋白表达

肝组织裂解后得到组织蛋白提取物,用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。电泳采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(10%),负载等量的不同组蛋白。然后将蛋白样品转移到 PVDF 膜(0.45 μm)上。将膜置于无蛋白快速封闭缓冲液中室温孵育 40 min,然后与一抗 Keap1 (1:5 000)、Nrf2 (1:2 000)、HO-1 (1:1 000)、GCLC (1:1 000)、GCLM (1:1 000)、NQO1 (1:1 000)、Caspase-3 (1:1 000)、cleaved-Caspase-3 (1:1 000)、Bcl-2 (1:1 000)、Bax (1:1 000) 和 β -actin (1:1 000) 孵育。TBST 洗涤 3 次后,用山羊抗兔 IgG (H+L) HRP (1:1 000) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 60 min,加入增强化学发光 ECL 溶液检测目的蛋白条带。最后,利用 Image-J 软件对蛋白质条带灰度值进行分析。

2.8 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有数据采用单因素方差分析(GraphPad Prism 9.0.0 软件),事后检验采用 Turkey's 检验。

3 结果

3.1 对 CPA 所致肝损伤小鼠肝指数、肝功能及病理形态学的影响

如图 1-A 所示,与对照组比较,模型组小鼠肝指数显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,PCA 高剂量组和 DG 组小鼠肝指数均显著升高($P<0.05$)。如图 1-B、C 所示,与对照组比较,模型组

AST、ALT 水平均显著升高($P<0.001$)。与模型组比较,各给药组小鼠 AST、ALT 水平均显著降低($P<0.01$),且呈质量浓度相关性。如图 1-D 所示,对照组小鼠的肝组织结构完整,肝细胞排列紧密。与对照组比较,模型组小鼠肝组织疏松,肝索排列紊乱,肝细胞水肿,细胞间隙增大,局部可见炎性细胞浸润。与模型组比较,各给药组小鼠肝组织排列逐渐紧密,细胞间隙减小,肝细胞水肿减轻,其中 PCA 高剂量组和 DG 组的效果更明显。

3.2 对 CPA 所致肝损伤小鼠肝脏细胞凋亡的影响

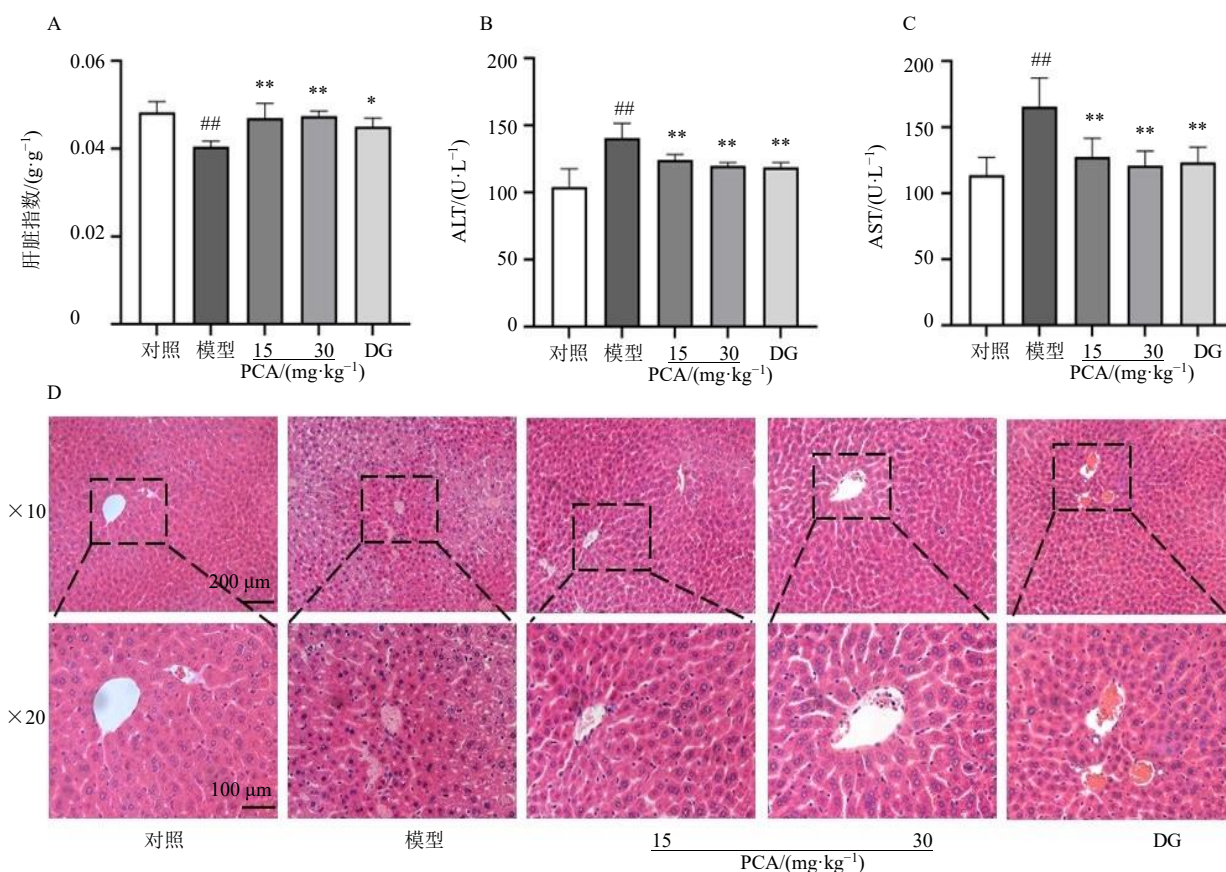
如图 2-A、B 所示, TUNEL 染色呈绿色荧光, DAPI 复染后在紫外激发下细胞核为蓝色荧光。与对照组比较,模型组小鼠肝脏中 TUNEL 的荧光强度显著升高($P<0.001$)。与模型组比较,各给药组 TUNEL 染色荧光强度均显著降低,PCA 的作用呈质量浓度依赖性($P<0.001$)。如图 3-A~D 所示,与对照组比较,模型组小鼠肝脏中 cleaved-Caspase-3、Bax 蛋白表达量均显著升高($P<0.01$), Bcl2 蛋白表达量显著降低($P<0.001$)。与模型组比较,cleaved-Caspase-3 和 Bax 蛋白表达均显著降低($P<0.05$), Bcl-2 蛋白表达均显著升高($P<0.001$)。结果表明,PCA 可以抑制 CPA 诱导的小鼠肝细胞凋亡。

3.3 对 CPA 所致肝损伤小鼠肝脏氧化应激的影响

为探究 PCA 对 CPA 诱导的肝损伤小鼠氧化应激的影响,本研究采用 DHE 染色检测 ROS 水平,生化分析检测抗氧化酶和脂质过氧化产物水平。ROS 阳性表达为绿色荧光,DAPI 复染后在紫外激发下细胞核为蓝色荧光。如图 4-A、B 所示,与对照组比较,模型组小鼠肝脏中 ROS 的表达显著升高($P<0.001$);与模型组比较,高剂量 PCA 组和 DG 组小鼠肝脏中 ROS 的表达明显降低($P<0.01$)。如图 4-C~F 所示,与对照组比较,模型组小鼠肝脏 SOD、CAT 和 GSH-Px 水平显著降低($P<0.01$),MDA 水平显著升高($P<0.001$);与模型组比较,高剂量 PCA 组和 DG 组小鼠肝脏 SOD、CAT 和 GSH-Px 水平均显著升高($P<0.05$),MDA 水平显著降低($P<0.001$)。结果表明,PCA 可以通过抑制氧化应激减轻小鼠急性肝损伤。

3.4 对 CPA 所致肝损伤小鼠肝脏 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路的影响

为进一步探究 PCA 抑制氧化应激的机制,本研究检测 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路及其下游蛋白的表达。如图 5-A 所示。与对照组比较,模型组小鼠肝



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1 对 CPA 所致肝损伤小鼠肝脏指数 (A)、肝功能 (B、C) 及病理形态学 (D) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effect on liver index (A), liver function (B, C) and pathological morphology (D) in CPA-induced mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

细胞核内 Nrf2 棕色沉积明显减少。与模型组比较, 高剂量 PCA 组小鼠肝细胞核内 Nrf2 棕色沉积明显增加, 说明更多的 Nrf2 参与了抗氧化能力的发挥。如图 5-B~H 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝脏中 Keap1 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.01$), Nrf2、HO-1、GCLC、GCLM、NQO1 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, PCA 各给药组和 DG 组 Keap1 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.01$), Nrf2、HO-1、GCLC、GCLM 和 NQO1 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.05$)。PCA 组和 DG 组之间无统计学差异。上述结果表明, PCA 通过调控 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路, 增强了 CPA 诱导的肝损伤小鼠的抗氧化能力。

4 讨论

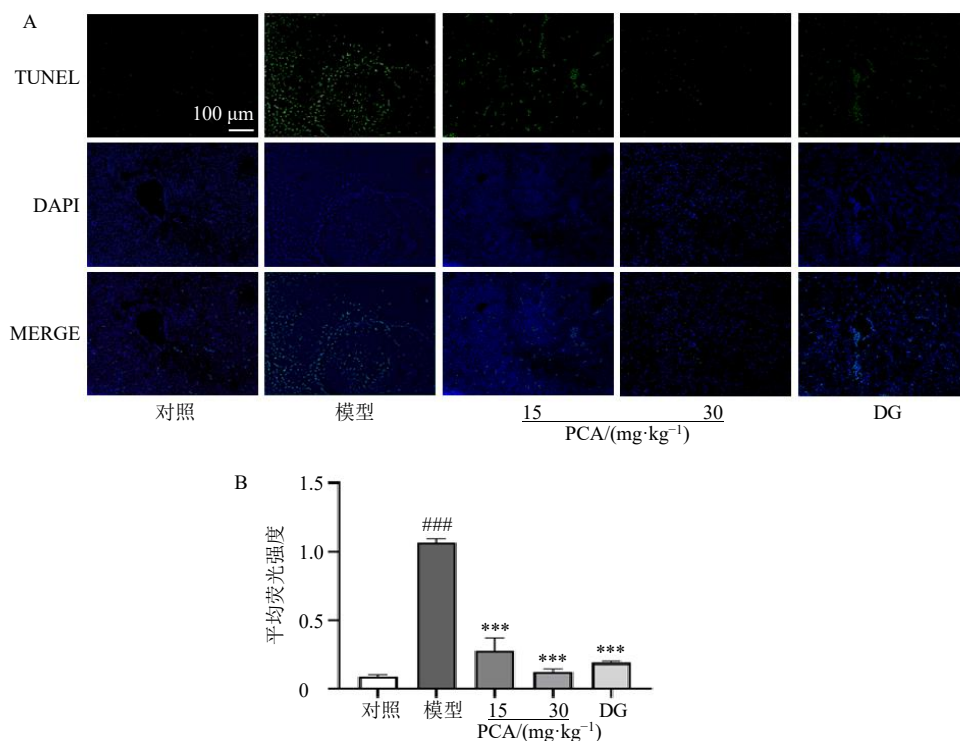
CPA 是临床上常用的免疫抑制剂和抗癌药物, 但是用药后造成的肝毒性大大限制了其应用, 亟需探寻能够对抗环磷酰胺所致肝毒性的药物。目前的研究多集中于考察药物对环磷酰胺所致肝损伤的治疗作用^[20-21], 而预防环磷酰胺所致肝损伤的药物研

究显得较为匮乏。本研究为发现能够预防环磷酰胺所致肝损伤的药物提供了实验依据。

DG 是一种从丹参根中提取的活性成分, 具有抗炎、抗氧化和免疫调节等广泛的药理活性^[22-23]。在亚洲国家, 已被广泛用于治疗多种类型的肝脏疾病以及由药物和化学品引起的肝毒性损伤^[24-25]。研究表明, DG 可以通过降低 Keap1 的表达, 增加 Nrf2 及相关 II 期抗氧化酶的表达来减轻丙戊酸诱导的肝损伤^[26]。因此, 本研究选择 DG 作为阳性对照药物。

PCA 是多种中草药 (如丹参、天麻等) 的主要成分, 具有毒性低、代谢速度快、不良反应少等诸多优点, 体内和体外实验证明其具有抗炎^[27-28]、抗氧化^[29]、抑制细胞凋亡^[30]、抗纤维化^[31]等诸多药理作用, 并被证实可以有效改善四氯化碳诱导的大鼠急性肝损伤^[32]。但是目前尚无关于 PCA 对 CPA 诱导的肝损伤影响的研究。

脏器指数是指动物的器官或组织质量与全身质量的比值, 可以直接反映动物的生理状态, 评价药

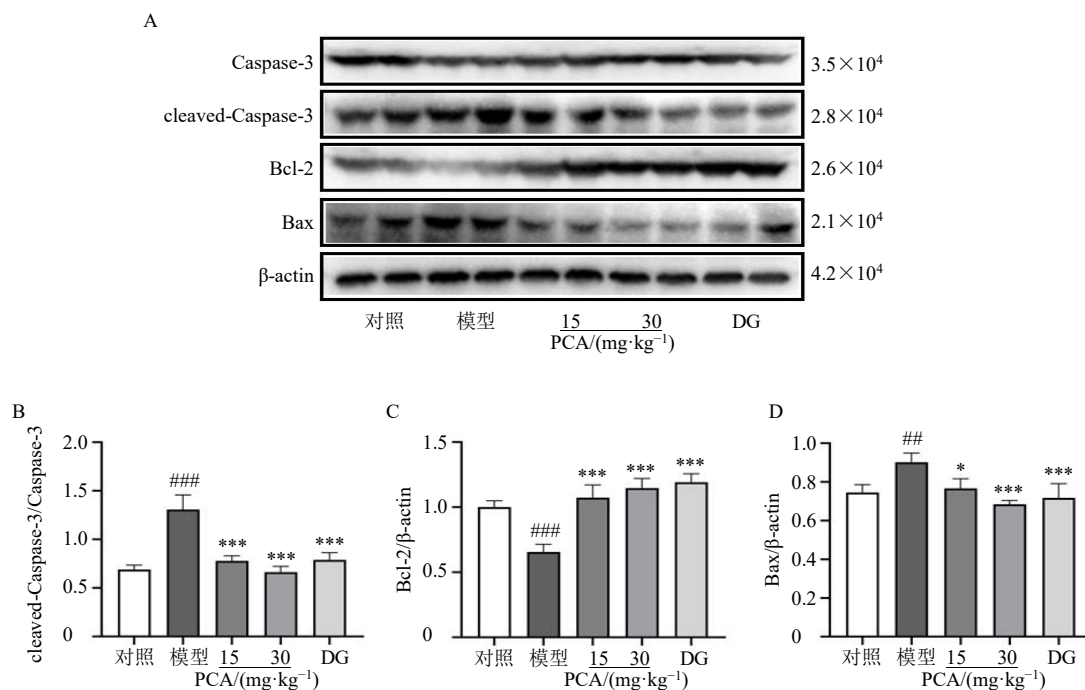


A-TUNEL 荧光染色 (×20); B-平均荧光强度。

A-TUNEL fluorescent staining (×20); B-average fluorescence intensity.

图 2 对 CPA 所致肝损伤小鼠肝脏细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 2 Effect on apoptosis of liver cells in CPA-induced liver injury mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

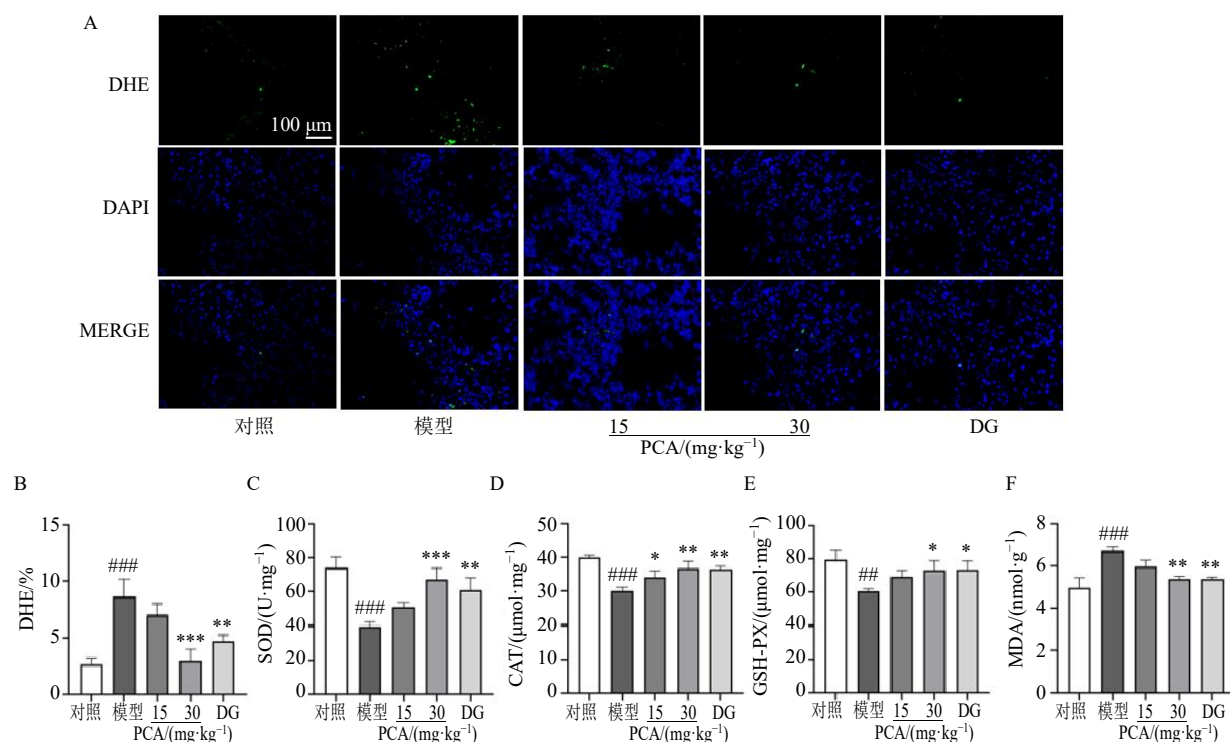


A-Caspase-3、cleaved-Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 蛋白质免疫印迹条带; B~D-半定量分析结果。

A-Caspase-3, cleaved Caspase-3, Bcl-2 and Bax protein immunoblot bands; B~D-results of semi-quantitative analysis.

图 3 对 CPA 所致肝损伤小鼠肝脏中凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 3 Effect on expression of apoptosis-related proteins in liver of mice with CPA-induced liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

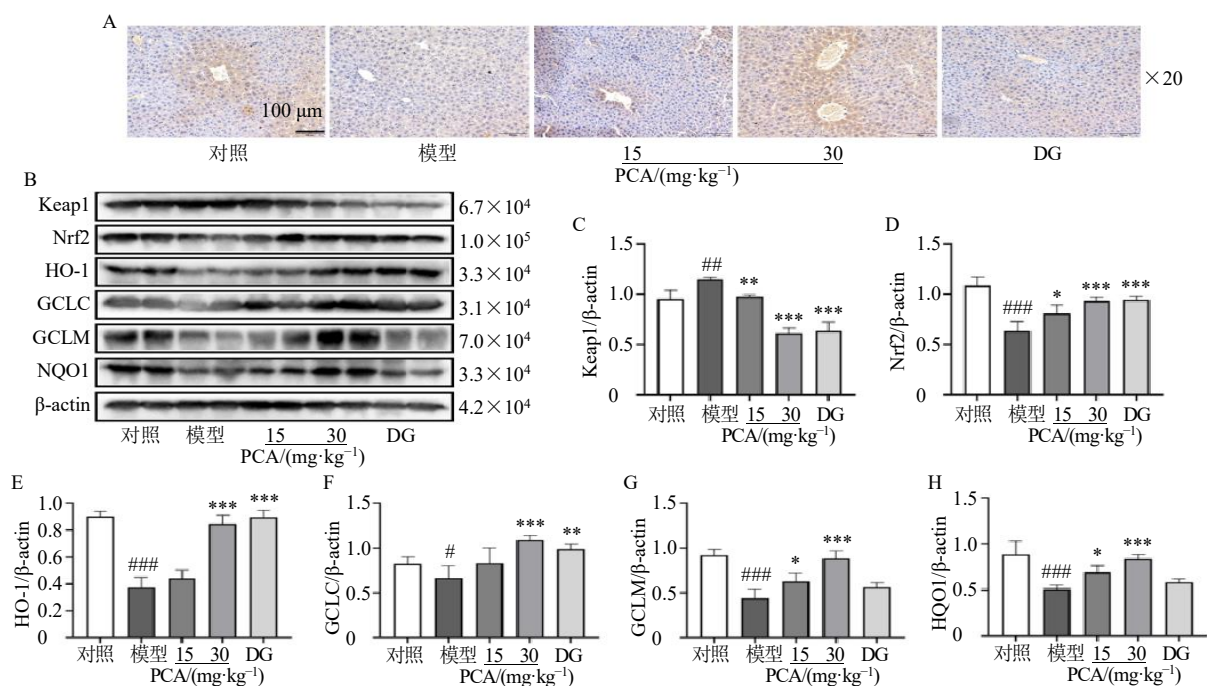


A-DHE 荧光染色 (×20); B-平均荧光强度; C~F-肝组织中 SOD、CAT、GSH-Px 和 MDA 水平。

A-DHE fluorescence staining (×20); B-average fluorescence intensity; C~F-levels of SOD, CAT, GSH-Px and MDA in liver tissue.

图 4 对 CPA 所致肝损伤小鼠肝脏氧化应激的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 4 Effect on hepatic oxidative stress in CPA-induced liver injury mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)



A-肝组织 Nrf2 免疫组织化学染色; B-蛋白质免疫印迹条带; C~H-半定量分析结果。

A-Nrf2 immunohistochemical staining of liver tissue; B-protein immunoblot bands; C~H-semi-quantitative analysis results.

图 5 对 CPA 诱导的肝损伤小鼠肝脏 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 5 Effect on expression of Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathway in mice with CPA-induced liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

物的毒性作用^[33]。与先前的研究相一致^[34-35]，在本研究中，CPA 干预后，小鼠肝脏指数明显下降，HE 染色结果也证实了 CPA 能诱导小鼠肝细胞水肿，导致肝细胞间形成空泡，排列紊乱等一系列病理损伤。结果证明，PCA 干预能显著提高小鼠肝脏指数，减轻肝细胞病理损伤。

当肝细胞发生炎症、肿胀或坏死时，ALT 和 AST 升高，这也表明肝脏受到了严重的损伤^[36]。因此，ALT 和 AST 常被作为反映肝功能的关键指标^[37]，而 CPA 可增加肝毒性，导致肝功能受损。本研究结果证明，PCA 能显著降低 ALT 和 AST 水平，减轻 CPA 引起的肝功能损害。

细胞凋亡，又称程序性细胞死亡，是一种主动的细胞死亡过程。TUNEL 是对完整的凋亡细胞核或凋亡小体的原位染色，能准确反映细胞凋亡的特点。Caspase 是一个调控细胞凋亡的蛋白酶家族，下游的 Caspase-3 作为执行者，可以直接激活细胞凋亡过程^[38]。线粒体外膜的完整性和细胞色素的释放受到 Bcl-2 蛋白家族调控，Bcl-2 蛋白家族由以 Bcl-2 为代表的抗凋亡蛋白和以 Bax 为代表的促凋亡蛋白组成^[39]。抗凋亡蛋白通过阻止线粒体间隙蛋白如细胞色素 C 和凋亡诱导因子的释放来抑制细胞凋亡。促凋亡蛋白则是刺激线粒体释放细胞色素 C，从而促进细胞凋亡^[40]。先前的研究证明，CPA 可在小鼠肝脏中产生大量 ROS，激活 Caspase-3，上调小鼠肝脏中 Bax 蛋白的表达，下调 Bcl-2 蛋白的表达，使 Bcl-2 失去维持线粒体外膜完整性的功能，阻断线粒体信号转导通路，导致细胞凋亡^[4,41]。本研究结果表明，PCA 能有效上调小鼠肝脏中 Bcl-2 的表达，显著降低小鼠肝脏中 cleaved-Caspase-3 和 Bax 的表达，抑制 CPA 诱导的小鼠肝细胞凋亡。

细胞凋亡与氧化应激存在密切的关系。外部的刺激和内部的代谢紊乱所引起的氧化应激损伤已被证明是触发细胞凋亡的关键因素之一。过多的自由基通过破坏 DNA 结构和提高线粒体膜通透性导致细胞凋亡^[42-43]。SOD、CAT 和 GSH-Px 是体内重要的抗氧化防御功能酶^[44]，能够清除超氧阴离子自由基、羟基自由基和过氧化氢等氧化物分子，维持氧化还原稳态，故被广泛用作评价氧化应激损伤的标志物^[45-46]。许多研究均证明氧化应激是 CPA 发挥细胞毒性和诱导肝损伤的关键机制之一^[47-48]。CPA 可刺激肝脏产生大量 ROS 和 MDA。前者破坏肝脏氧

化还原稳态，干扰以 SOD 和 GSH-Px 为主要成员的抗氧化酶防御系统，甚至导致细胞凋亡^[49]，后者破坏细胞膜结构，进一步破坏抗氧化系统的不平衡^[50]。本研究结果证明，PCA 可以显著降低 CPA 干预后的小鼠肝脏中 ROS 和 MDA 的生成，提高 SOD、CAT 和 GSH-Px 的水平，从而提高肝脏抗氧化系统的活性，抑制氧化应激。

Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路是体内非常重要的抗氧化信号通路。Nrf2 是氧化还原反应的主控因子。在正常细胞中，Nrf2 受负调控蛋白 Keap1 的影响而位于细胞质内^[51]。当受到刺激时，Nrf2 与 Keap1 解离并活化，活化的 Nrf2 进入细胞核与受体蛋白及多种下游抗氧化反应元件结合，激活抗氧化酶，解毒 HO-1、NQO1 等相关酶，发挥抗氧化作用^[52]。GCLC 和 GCLM 是参与谷胱甘肽合成的 2 个关键酶。实验证明 Nrf2 可以提高二者启动子的活性，从而促进 GSH-Px 的合成，提高肝脏的抗氧化能力^[53]。当 ROS 过量生成时，Nrf2 及下游相关蛋白和酶表达减少，提示氧化应急损伤和抗氧化防御能力减弱，难以弥补 ROS 过量生成所造成的损伤，形成恶性循环^[54]。本研究结果证明，PCA 可显著降低 Keap1 蛋白的表达，引起 Nrf2 的核易位，上调 Nrf2、HO-1、GCLC、GCLM 和 NQO1 蛋白的表达，从而有效增强肝脏的抗氧化能力，抑制氧化应激损伤。

综上，本研究发现，PCA 可以减轻 CPA 诱导的小鼠急性肝损伤。一方面，PCA 可以影响 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白表达，并能提高抗氧化酶 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性、抑制活性氧的产生来抑制肝脏氧化应激。另一方面，PCA 可以抑制肝细胞的凋亡。且各指标 PCA 组和 DG 组之间无统计学差异。因此，PCA 有望成为抗急性肝损伤的有效药物。PCA 是否通过调节 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路抑制氧化应激、细胞凋亡而发挥作用，还有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhang Y, Han Y, He J, *et al.* Digestive properties and effects of *Chimonanthus nitens* Oliv polysaccharides on antioxidant effects *in vitro* and in immunocompromised mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 185: 306-316.
- [2] Zhai J, Song Z, Chang H, *et al.* He-Wei Granule enhances anti-tumor activity of cyclophosphamide by changing tumor microenvironment [J]. *Chin Herb Med*. 2021, 14(1): 79-89.
- [3] Naqvi S, Sharma H, Flora S J. Lactobionic acid conjugated

- quercetin loaded organically modified silica nanoparticles mitigates cyclophosphamide induced hepatocytotoxicity [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 8943-8959.
- [4] Xu L X, Yan L J, Huang S P. Ganoderic acid A against cyclophosphamide-induced hepatic toxicity in mice [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2019, 33(4): e22271.
- [5] Mosedale M, Watkins P B. Drug-induced liver injury: Advances in mechanistic understanding that will inform risk management [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2017, 101(4): 469-480.
- [6] Circu M L, Aw T Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(6): 749-762.
- [7] Yao L L, Du Q, Yao H D, *et al.* Roles of oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in selenium deficiency-induced apoptosis in chicken liver [J]. *Biometals*, 2015, 28(2): 255-265.
- [8] Jiang X X, Zhou Y F, Zhang Y, *et al.* Hepatoprotective effect of pyrroloquinoline quinone against alcoholic liver injury through activating Nrf2-mediated antioxidant and inhibiting TLR4-mediated inflammation responses [J]. *Process Biochem*, 2020, 92: 303-312.
- [9] Caglayan C, Temel Y, Kandemir F M, *et al.* Naringin protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity through modulation of oxidative stress, inflammation, apoptosis, autophagy, and DNA damage [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2018, 25(21): 20968-20984.
- [10] 罗美美, 朱星宇, 胡乐涛, 等. 基于 Nrf2/HO-1 信号通路的中药有效成分缓解肝损伤研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(7): 1638-1644.
- [11] Guo Y, Yang J H, Cao S D, *et al.* Effect of main ingredients of Danhong Injection against oxidative stress induced autophagy injury via miR-19a/SIRT1 pathway in endothelial cells [J]. *Phytomedicine*, 2021, 83: 153480.
- [12] Kim K J, Kim M A, Jung J H. Antitumor and antioxidant activity of protocatechualdehyde produced from *Streptomyces lincolnensis* M-20 [J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(12): 1572-1577.
- [13] Cao S D, Chen S M, Qiao X L, *et al.* Protocatechualdehyde rescues oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced endothelial cells injury by inducing autophagy and inhibiting apoptosis via regulation of SIRT1 [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 846513.
- [14] 杨玉琴, 昝国平, 张志超, 等. 复方丹参保肝颗粒入血成分研究 [J]. *现代中药研究与实践*, 2016, 30(3): 37-40.
- [15] Wu M M, Wang C L, Mai C T, *et al.* Flavonoids from *Livistona chinensis* fruit ameliorates LPS/D-GalN-induced acute liver injury by inhibiting oxidative stress and inflammation [J]. *J Funct Foods*, 2019, 61: 103460.
- [16] Lv T, Yao X X. Comparison of protocatechuic aldehyde in *Radix Salvia miltiorrhiza* and corresponding pharmacological sera from normal and fibrotic rats by high performance liquid chromatography [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(14): 2195-2200.
- [17] 张景富, 肖雨, 何继江, 等. 原儿茶醛对环磷酰胺诱导急性肾损伤的保护作用及机制研究 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(6): 1217-1223.
- [18] Cengiz M, Kutlu H M, Peker Cengiz B, *et al.* Escin attenuates oxidative damage, apoptosis and lipid peroxidation in a model of cyclophosphamide-induced liver damage [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2022, 45(3): 1180-1187.
- [19] Cengiz M, Cetik Yildiz S, Demir C, *et al.* Hepatopreventive and anti-apoptotic role of boric acid against liver injury induced by cyclophosphamide [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2019, 53: 1-7.
- [20] 徐博, 吴畏难, 崔晓丽, 等. 杨梅素对环磷酰胺致小鼠肝损伤的保护作用及机制探讨 [J]. *营养学报*, 2020, 42(2): 178-182.
- [21] 徐博, 吴畏难, 来永巍, 等. 大豆异黄酮对环磷酰胺所诱导的小鼠肝损伤的防治作用及其机制 [J]. *营养学报*, 2021, 43(3): 260-264.
- [22] Zhu X L, Chen C, Ye D, *et al.* Diammonium glycyrrhizinate upregulates PGC-1 α and protects against A β ₁₋₄₂-induced neurotoxicity [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35823.
- [23] Hou S Z, Li Y, Zhu X L, *et al.* Ameliorative effects of diammonium glycyrrhizinate on inflammation in focal cerebral ischemic-reperfusion injury [J]. *Brain Res*, 2012, 1447: 20-27.
- [24] Feng C, Wang H X, Yao C F, *et al.* Diammonium glycyrrhizinate, a component of traditional Chinese medicine Gan-Cao, prevents murine T-cell-mediated fulminant hepatitis in IL-10- and IL-6-dependent manners [J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(10): 1292-1298.
- [25] Zhi Q L, Jing L D. Systematic review of diammonium glycyrrhizinate in the treatment of drug-induced liver injury [J]. *China Pharmacy*, 2010, 21(12): 1100-1105.
- [26] Jin J, Xiong T Q, Hou X Y, *et al.* Role of Nrf2 activation and NF- κ B inhibition in valproic acid induced hepatotoxicity and in diammonium glycyrrhizinate induced protection in mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 73: 95-104.
- [27] Wei G, Guan Y, Yin Y, *et al.* Anti-inflammatory effect of protocatechuic aldehyde on myocardial ischemia/reperfusion injury *in vivo* and *in vitro* [J]. *Inflammation*, 2013, 36(3): 592-602.
- [28] 张景富, 肖雨, 何继江, 等. 原儿茶醛对环磷酰胺诱导急性肾损伤的保护作用及机制研究 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(6): 1217-1223.
- [29] Chang Z Q, Gebru E, Lee S P, *et al.* *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of protocatechualdehyde isolated from *Phellinus gilvus* [J]. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2011, 57(1): 118-122.
- [30] Xing Y L, Zhou Z, Agula, *et al.* Protocatechuic aldehyde

- inhibits lipopolysaccharide-induced human umbilical vein endothelial cell apoptosis via regulation of Caspase-3 [J]. *Phytother Res*, 2012, 26(9): 1334-1341.
- [31] Li C M, Jiang W L, Zhu H B, *et al.* Antifibrotic effects of protocatechuic aldehyde on experimental liver fibrosis [J]. *Pharm Biol*, 2012, 50(4): 413-419.
- [32] Zhang S J, Gai Z B, Gui T, *et al.* Antioxidant effects of protocatechuic acid and protocatechuic aldehyde: Old wine in a new bottle [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 6139308.
- [33] Piao Y, Liu Y N, Xie X D. Change trends of organ weight background data in sprague dawley rats at different ages [J]. *J Toxicol Pathol*, 2013, 26(1): 29-34.
- [34] Habibi E, Shokrzadeh M, Chabra A, *et al.* Protective effects of *Origanum vulgare* ethanol extract against cyclophosphamide-induced liver toxicity in mice [J]. *Pharm Biol*, 2015, 53(1): 10-15.
- [35] Jiang S Q, Zhang Z W, Yu F M, *et al.* Ameliorative effect of low molecular weight peptides from the head of red shrimp (*Solenocera crassicornis*) against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in mice [J]. *J Funct Foods*, 2020, 72: 104085.
- [36] Huang X J, Choi Y K, Im H S, *et al.* Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) detection techniques [J]. *Sensors*, 2006, 6(7): 756-782.
- [37] Kasarala G, Tillmann H L. Standard liver tests [J]. *Clin Liver Dis*, 2016, 8(1): 13-18.
- [38] Chae I H, Park K W, Kim H S, *et al.* Nitric oxide-induced apoptosis is mediated by Bax/Bcl-2 gene expression, transition of cytochrome c, and activation of Caspase-3 in rat vascular smooth muscle cells [J]. *Clin Chim Acta*, 2004, 341(1/2): 83-91.
- [39] Adams J M, Cory S. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival [J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1322-1326.
- [40] Perfettini J L, Reed J C, Israël N, *et al.* Role of Bcl-2 family members in caspase-independent apoptosis during *Chlamydia* infection [J]. *Infect Immun*, 2002, 70(1): 55-61.
- [41] Fouad A A, Qutub H O, Al-Melhim W N. Punicalagin alleviates hepatotoxicity in rats challenged with cyclophosphamide [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 45: 158-162.
- [42] Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(Suppl 1): 173-179.
- [43] Zhang N, Tian Y, Wang Y, *et al.* Ameliorative effect of *Lactobacillus plantarum* Lp2 against cyclophosphamide-induced liver injury in mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 169: 113433.
- [44] Tang Y P, Zhao R, Pu Q Y, *et al.* Investigation of nephrotoxicity on mice exposed to polystyrene nanoplastics and the potential amelioration effects of DHA-enriched phosphatidylserine [J]. *Sci Total Environ*, 2023, 892: 164808.
- [45] Inal M E, Kanbak G, Sunal E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging [J]. *Clin Chim Acta*, 2001, 305(1/2): 75-80.
- [46] Kaynar H, Meral M, Turhan H, *et al.* Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Lett*, 2005, 227(2): 133-139.
- [47] Pratheeshkumar P, Kuttan G. Ameliorative action of *Vernonia cinerea* L. on cyclophosphamide-induced immunosuppression and oxidative stress in mice [J]. *Inflammopharmacology*, 2010, 18(4): 197-207.
- [48] Lee S I, Kang K S. Omega-3 fatty acids modulate cyclophosphamide induced markers of immunosuppression and oxidative stress in pigs [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 2684.
- [49] Cuce G, Çetinkaya S, Koc T, *et al.* Chemoprotective effect of vitamin E in cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in rats [J]. *Chem Biol Interact*, 2015, 232: 7-11.
- [50] Sherif I O. The effect of natural antioxidants in cyclophosphamide-induced hepatotoxicity: Role of Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 61: 29-36.
- [51] Rajput S A, Liang S J, Wang X Q, *et al.* Lycopene protects intestinal epithelium from deoxynivalenol-induced oxidative damage via regulating Keap1/Nrf2 signaling [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(9): 1493.
- [52] Zhou H S, Wang Y, You Q D, *et al.* Recent progress in the development of small molecule Nrf2 activators: A patent review (2017-present) [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2020, 30(3): 209-225.
- [53] Hayes J D, McMahon M. NRF2 and KEAP1 mutations: Permanent activation of an adaptive response in cancer [J]. *Trends Biochem Sci*, 2009, 34(4): 176-188.
- [54] Li J Y, Jiang H J, Wu P F, *et al.* Toxicological effects of deltamethrin on quail cerebrum: Weakened antioxidant defense and enhanced apoptosis [J]. *Environ Pollut*, 2021, 286: 117319.

[责任编辑 罗 曦]