

诸葛菜种子水提物激活 AMPK/AKT/GSK-3 β 通路保护 对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤

庞敏^{1,2}, 单宇¹, 王菲菲^{1,3}, 杨淑贤¹, 李立勇¹, 曹丽¹

(1. 中国医学科学院, 北京协和医学院, 药用植物研究所, 北京 100193) (2. 哈尔滨商业大学药学院, 药物工程技术研究中心, 黑龙江哈尔滨 150076) (3. 广西中医药大学药学院, 广西南宁 530001)

摘要: 本研究诸葛菜种子水提物对对乙酰氨基酚 (APAP) 诱导小鼠急性肝损伤的保护作用。健康雄性 C57 BL/6J 小鼠被随机分为 7 组: 正常组, 模型组, 双环醇阳性对照组 (200 mg/kg), 葵花护肝片阳性对照组 (350 mg/kg), 诸葛菜种子水提物低 (125 mg/kg)、中 (250 mg/kg)、高 (500 mg/kg) 剂量组。各组均灌胃给药, 1 次/d, 连续灌胃给药 4 d, 除正常组外其余各组均腹腔注射 APAP 溶液 (450 mg/kg) 建立急性肝损伤模型, 处死小鼠。检测血清中丙氨酸氨基转移酶 (ALT), 谷草转氨酶 (AST) 活性与胆红素 (TBIL) 水平; 肝组织中超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、还原型谷胱甘肽 (GSH); HE 染色观察小鼠肝组织病理变化; 蛋白印迹法检测磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶 (p-AMPK)、磷酸化 AKT 蛋白 (p-AKT)、磷酸化葡萄糖合成激酶 3 β (p-GSK-3 β)、磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 (p-JNK)、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、活化半胱氨酸蛋白酶蛋白-9 抗体 (Caspase-9)、活化半胱氨酸蛋白酶蛋白-3 抗体 (Caspase-3) 蛋白的表达。与模型组相比, 诸葛菜各剂量组均能明显改善肝脏病理变化, 中剂量组 ALT, AST 活性分别降低了 48.73%、59.11%, 高剂量组分别降低了 71.38%、59.33%, 中剂量组 SOD 和 GSH 分别上升了 45.05%、219.45%, 高剂量组 SOD 和 GSH 分别上升了 48.68% 和 232.80%, 同时可致肝组织中 p-JNK、Bax、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达水平显著减少, Bcl-2、p-AMPK、p-AKT、p-GSK-3 β 蛋白表达水平显著增加。其机制可能与 AMPK/AKT/GSK-3 β 信号通路被激活有关。

关键词: 诸葛菜种子水提物; 对乙酰氨基酚; 急性肝损伤; AMPK/AKT/GSK-3 β

文章编号: 1673-9078(2020)07-34-41

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.7.1240

Protective Effect of Water Extracts of *Orychophragmus violaceus* Seeds on Acetaminophen-induced Acute Liver Injury in Mice: Roles of Activating Hepatic AMPK/AKT/GSK-3 β Signaling

PANG Min^{1,2}, SHAN Yu¹, WANG Fei-fei^{1,3}, YANG Shu-xian¹, LI Li-yong¹, CAO Li¹

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China) (2. College of Pharmacy, Pharmaceutical Engineering Technology Research Center, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

(3. Graduate School, Guangxi University of Chinese Medicine, Guangxi, Nanning 530001, China)

Abstract: The antioxidant capacity of water extracts of *Orychophragmus violaceus* Seeds and the protective effects on liver injury induced by acetaminophen (APAP) were investigated. Male C57 BL/6J mice were randomly divided into 7 groups: normal group, model group, double ringol positive control group (200 mg/kg),葵花护肝片 positive control group (350 mg/kg), *Orychophragmus violaceus* seed water extract low (125 mg/kg), medium (250 mg/kg), high (500 mg/kg) dose groups. All groups were gavage with the extract, once a day, for 4 days. Except for the normal group, all other groups were intraperitoneally injected with APAP solution (450 mg/kg) to establish the acute liver injury model, and the mice were sacrificed. The serum levels of ALT, AST, and TBIL were detected. The levels of SOD, MDA, and GSH in liver tissue were detected. HE staining was used to observe the pathological changes in mouse liver tissue. Western blotting was used to detect the expression of p-AMPK, p-AKT, p-GSK-3 β , p-JNK, Bcl-2, Bax, Caspase-3, and Caspase-9. Compared with the model group, all dose groups of *Orychophragmus violaceus* seed water extract could significantly improve the pathological changes in liver tissue. The medium dose group significantly reduced the activity of ALT and AST by 48.73% and 59.11%, respectively. The high dose group significantly reduced the activity of ALT and AST by 71.38% and 59.33%, respectively. The medium dose group significantly increased the levels of SOD and GSH by 45.05% and 219.45%, respectively. The high dose group significantly increased the levels of SOD and GSH by 48.68% and 232.80%, respectively. At the same time, the expression levels of p-JNK, Bax, Caspase-3, and Caspase-9 in liver tissue were significantly reduced, while the expression levels of Bcl-2, p-AMPK, p-AKT, and p-GSK-3 β were significantly increased. The mechanism may be related to the activation of the AMPK/AKT/GSK-3 β signaling pathway.

引文格式:

庞敏, 单宇, 王菲菲, 等. 诸葛菜种子水提物激活 AMPK/AKT/GSK-3 β 通路保护对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤[J]. 现代食品科技, 2020, 36(7): 34-41

PANG Min, SHAN Yu, WANG Fei-fei, et al. Protective effect of water extracts of *Orychophragmus violaceus* seeds on acetaminophen-induced acute liver injury in mice: roles of activating hepatic AMPK/AKT/GSK-3 β signaling [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(7): 34-41

收稿日期: 2019-12-16

基金项目: 北京市自然科学基金青年科学基金项目 (7164281)

作者简介: 庞敏 (1995-), 女, 在读研究生, 研究方向: 天然药物抗肿瘤药理学

通讯作者: 曹丽 (1966-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 天然药物抗肿瘤药理学

by acetaminophen in mice were investigated. C57BL/6J male mice were randomly divided into seven groups: normal group, model group, bicycle control group (200 mg/kg), Kuihua Huguang tablets control group (350 mg/kg), water extracts of *Orychophragmus violaceus* seeds low-dose group (125 mg/kg), water extracts of *Orychophragmus violaceus* seeds middle-dose group (250 mg/kg), and water extracts of *Orychophragmus violaceus* seeds high-dose group (500 mg/kg). The mice were intragastrically administered with drugs or distilled water according to the body weight once a day. Four days later, all of the groups except for the normal group were treated with APAP (450 mg/kg) through intraperitoneal injection to establish the acute liver injury model. The mice were killed. The levels of glutamic-pyruvic transaminase, glutamic oxalacetic transaminase and total bilirubin in serum were detected. What's more, the activities of superoxide dismutase and the level of glutathione and malondialdehyde in liver tissue were detected. HE staining was used to observe the pathological changes of liver tissue in mice. Western blot was used to detect the expressions of p-AMPK, p-AKT, p-GSK-3 β , p-JNK, Bcl-2, Bax, Caspase-9 and Caspase-3. Compared with the model group, water extracts of *Orychophragmus violaceus* seeds could significantly improve the pathological conditions of liver, and the ALT and AST activities in the middle-dose group were reduced by 48.73% and 59.11%, respectively; and the high-dose group were reduced by 71.38% and 59.33%, respectively, in serum of APAP induced liver injury mice. The activities of SOD and GSH were increased by 45.05% and 219.45% respectively in the middle dose group and 48.68% and 232.80% respectively in the high dose group. Meanwhile, water extracts of *Orychophragmus violaceus* seeds down-regulated the expressions of p-JNK, Bax, Caspase-3, and Caspase-9 ($p<0.05$) and up-regulated the expressions of Bcl-2, p-AMPK, p-AKT and p-GSK-3 β ($p<0.05$). It suggested that water extracts of *Orychophragmus violaceus* seeds has protective effect against APAP induced hepatocyte apoptosis by up-regulating the AMPK/AKT/GSK-3 β signaling pathway.

Key words: water extracts of *Orychophragmus violaceus* seeds; APAP; acute liver injury; AMPK/AKT/GSK-3 β

肝脏是药物代谢的主要场所, 由于药物滥用不断增加, 药物性肝损伤的发病率也逐年上升, 严重时可引发脂肪肝、肝癌、肝功能衰竭, 甚至可引发死亡^[1]。对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 肝损伤模型是常用的药物性肝损伤模型, 对乙酰氨基酚是一种全世界广泛使用的镇痛和解热药^[2]。服用常规剂量的 APAP, 其可经 II 相代谢与体内的葡萄糖醛酸等结合成大分子缀合物而排毒, 不会产生毒性代谢产物 N-乙酰基-对苯醌亚胺 (NAPQI); 然而长时间或大量服用 APAP 会导致毒性代谢产物 N-乙酰基-对苯醌亚胺大量蓄积, 通过耗竭谷胱甘肽和产生活性氧, 引起氧化应激、线粒体损伤、最终导致肝细胞凋亡、坏死。在美国每年因 APAP 过量引起的死亡人数多达 500 人, 在我国因过量服用 APAP 导致的药物性肝损伤也成为严重的医疗卫生问题^[3]。目前在临床上对于 APAP 过量导致药物性肝损伤的治疗, 效果并不理想。因此, 需要寻找新的治疗 APAP 过量导致的药物性肝损伤的药物。

诸葛菜 (*Orychophragmus violaceus*) 又称二月兰, 诸葛菜属, 十字花科草本植物^[4]。已有研究表明, 诸葛菜含有儿茶素、槲皮素、水杨酸、腺苷等多种化学成分可作为保健食品被人们长期使食用^[5]。本课题组前期研究已证实诸葛菜种子水提取物中诸葛菜碱 I、表告依春和 ZNL-11 具有明显的肝保护作用 and 显著的抗氧化活性^[6]。本实验采用一次性腹腔注射 APAP 诱导小鼠急性严重肝损伤的方法, 进一步研究诸葛菜种子水提取物对药物急性肝损伤的保护作用, 同时探讨诸葛菜种

子水提取物是否通过抑制 APAP 诱导肝细胞凋亡而发挥保护肝损伤作用, 为今后诸葛菜种子水提取物的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性健康的 C57BL/6J 小鼠, SPF 级, 18~20 g, 购自于北京斯贝福生物技术有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2017-0005。饲养在 SPF 级屏障环境中, 12 h 昼夜交替, 温度 (25 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$, 湿度 55% $\pm$ 5%, 自由进食和饮水。

1.2 药物与试剂

诸葛菜种子采自于 2017 年 9 月北京市, 经中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所丁万隆研究员鉴定, 标本保存于北京协和医学院药用植物研究所标本室 (NO.150811)。样品的提取: 取 5 kg 诸葛菜种子, 加 50 L 的水, 煎煮 2 次, 每次 2 h, 合并提取液, 浓缩, 真空干燥, 得到水提取物 450 g, 每 1 g 水提取物相当于生药量 90 g/kg, 于阴凉干燥处保存。对乙酰氨基酚 (美国 Sigmaaldrich 试剂公司, 批号 A800441) 与 1xPBS 缓冲液按比例配制成质量浓度为 22.5 mg/mL 的溶液, 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅加热至完全溶解; 双环醇 (北京协和药厂, 批号 H20040467), 葵花护肝片 (葵花药业, 批号 Z20003336); 谷丙转氨酶 (glutamic-pyruvic transaminase, ALT), 谷草转氨酶 (glutamic oxalacetic

transaminase, AST), 总胆红素 (total bilirubin, TBIL) 自动生化仪试剂盒购自中生北控生物科技有限公司生产批号分别为 20180741, 20180761, 20180471; 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 试剂盒、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒均购自南京建成生物工程有限公司生产批号分别为 20190417, 20190509, 20190510; GAPDH, Bcl-2, Bax, P-AKT, P-AMPK, Caspase-3; 羊抗兔 IgG 抗体均购自美国 CST 公司生产货号分别为 2118S, 3498S, 2772S, 4069S, 5256S, 9662S, 7074P2; p-JNK, Caspase-9, p-GSK-3 β 均购 Santa Cruze 公司生产货号分别为 sc-6254, sc-8008, sc-373800, 实验用的其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器与设备

全自动生化分析仪 (Beckman Coulter 公司, 型号 AU480); -80 °C 冰箱 (海尔公司); 电子天平 (梅特勒托利多仪器有限公司, 型号 AL104); 离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司, 型号 TGL-16M); 酶标仪 (Thermo 公司, 型号 Multiskan FC); 凝胶成像仪 (美国 Bio-rad 公司, 型号 chemida XRS)。

1.4 方法

1.4.1 动物分组、给药

健康雄性 C57/6J 小鼠 56 只, 饮食自由, 适应性饲 3 d 后, 随机分为 7 组, 分别为正常对照组, 对乙酰氨基酚模型组, 葵花护肝片阳性对照组 (350 mg/kg), 双环醇阳性对照组 (200 mg/kg), 诸葛菜种子水提取物低 (125 mg/kg)、中 (250 mg/kg)、高 (500 mg/kg) 剂量组。各组均采用灌胃给药, 正常组、模型组灌胃给予相应的蒸馏水, 阳性对照组及诸葛菜组均灌胃给予相应药物, 连续灌胃给药 4 d, 每天观察记录动物的行为饮食状态, 每 2 d 称一次体质量, 记录下来。

1.4.2 建立对乙酰氨基酚肝损伤模型及脏器指数的计算

各组连续灌胃给药 4 d, 第 4 d 给药 1 h 后, 模型组、阳性对照组、诸葛菜种子水提取物各剂量组均依次腹腔注射对乙酰氨基酚溶液 (450 mg/kg) 造模, 造模完成后禁食不禁水。12 h 后称重记录体质量, 摘眼球取血, 脱臼处死后解剖取肝脏, 用预冷的生理盐水把肝表面冲洗干净, 并用滤纸将多余的水分吸干, 电子天平精密称重, 计算肝指数。取完材后迅速淋上液氮放入 -80 °C 冰箱保存。

脏器指数=脏器质量 (mg) / 体质量 (g) $\times$ 100%

1.4.3 血清中 ALT、AST、TBIL 活性的检测

各组小鼠均摘眼球取血, 样品在 4 °C 中静置 3 h 待血液凝固后, 4000 r/min 离心 10 min, 用移液枪吸取上清, 分装于 1.5 的 EP 管中, -20 °C 保存, 用于第二天生化检测。检测时将血清与生理盐水按 1:2 稀释, 全自动生化仪检测血清中 ALT、AST、TBIL 的活性。

1.4.4 肝组织 SOD、MDA、GSH 水平的测定

取冻存的小鼠肝组织 100 mg 左右, 加入 9 倍量生理盐水作为匀浆介质, 用匀浆机制成 10% 小鼠肝组织匀浆液, 全过程应在冰上操作, 4 °C, 3500 r/min 离心 10 min, 为避免反复冻融取上清液分装成 3 份, 置 -20 °C 保存。根据试剂盒说明书检测肝组织总蛋白含量, SOD 的活性, GSH 和 MDA 含量。

1.4.5 肝脏病理学检测

解剖时将小鼠肝脏左叶剪下置于 4% 甲醛溶液固定 12 h~24 h。将固定后的肝脏用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液浸泡过夜, 酒精脱水, 石蜡包埋及切片等步骤制成 4 μ m 石蜡切片。经脱蜡及乙醇复水后进行苏木素-伊红 (HE) 染色 20 s, 再用 75% 乙醇脱水, 脱水后将组织切片中的 75% 乙醇用二甲苯置换出, 最后封片, 已备观察。

1.4.6 Western blot 法检测相关蛋白表达

称取 100 mg 左右的肝脏组织, 加入 9 倍量的生理盐水, 制成肝匀浆。4 °C, 3500 r/min 离心 15 min, 弃上清, 在沉淀中加入裂解液, 每隔 20 min 涡旋一次, 超 30 s, 待裂解完全后, 4 °C, 12000 r/min 离心 10 min, 用移液枪吸取上清, 进行 BCA 蛋白定量, -80 °C 保存备用, 用于 Western blot 检测, 整个操作过程于冰上进行。配胶, 进行 SDS-PAGE 电泳分离, 然后电转形成转膜“三明治”, 目的是将已分离蛋白条带转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 分别以 1:1000 稀释 Bcl-2、Bax、p-AMPK、p-AKT、p-GSK-3 β 、GAPDH 抗体, 以 1:500 稀释 p-JNK, Caspase-9, Caspase-3 抗体, 封一抗于 4 °C 中过夜, TBST 洗 3 次, 每次 15 min, 封二抗, 室温孵 2 h, TBST 洗 3 次, 每次 15 min, 完成后加入显色液于凝胶成像仪中显影成像, 并用 ImageJ 软件进行条带的定量分析。

1.4.7 统计结果处理

实验数据以 $\bar{X} \pm S$ 表示, 采用 SPSS 21.0 软件进行单因素方差分析和 t 检验等处理, 以 LSD 法统计组间差异, $p < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

目前, 草药和天然产品的开发被认为是有效治疗药物性肝损伤的主要方法^[7]。本课题组前期研究表明

[8,9], 诸葛菜种子水提物对酒精肝损、四氯化碳肝损均有良好的保肝效果。与这两种肝损伤模型相比, APAP 引起的肝损伤动物模型的代谢和中毒机制更接近临床实际, 又具有简便、廉价、时间短等众多优点, 近年逐渐成为国内外主要的药物性肝损伤动物模型^[10,11]。由本实验结果可知, 模型组与正常组相比 ALT、AST 活性明显升高 ($p<0.001$); GSH 的含量及 SOD 活性显著下降 ($p<0.05$), MDA 含量显著上升 ($p<0.001$); 同时肝脏系数也明显增大 ($p<0.05$); 病理切片结果显示, APAP 模型组肝细胞变性坏死程度严重, 表明 APAP 导致了严重的急性肝损伤。给予诸葛菜种子水提物能明显改善 APAP 造成的上述肝损伤情况。

2.1 诸葛菜种子水提物对对乙酰氨基酚致小鼠急性肝损伤肝脏指数的影响

表 1 诸葛菜种子水提物对小鼠肝脏指数的影响

Table 1 Effect of water extracts of *Orychophragmus violaceus*

seeds on liver index in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)		
组别	剂量/(mg/kg)	肝指数/%
正常组	-	4.24±0.43
模型组	-	6.34±0.40 ^{###}
双环醇	200	5.23±0.57 ^{***}
葵花护肝片	350	5.34±0.35 ^{***}
诸葛菜提取物	125	5.13±0.48 ^{***}
	250	5.32±0.38 ^{***}
	500	5.37±0.53 ^{***}

注: 与正常组比较[#] $p<0.05$, ^{##} $p<0.01$, ^{###} $p<0.001$; 与模型组比较^{*} $p<0.05$, ^{**} $p<0.01$, ^{***} $p<0.001$ (表 2, 3 同)。

与正常组相比, 模型组小鼠肝指数上升了 49.51%, 具有极显著差异 ($p<0.001$), 表明模型组小

鼠有明显的肝肿胀情况, 造模成功; 与模型组相比, 诸葛菜种子水提物低、中、高剂量组肝指数分别下降了 19.10%、16.09%、15.30%, 而阳性药双环醇与葵花护肝片肝指数分别下降了 17.51%、15.70%, 表明诸葛菜种子水提物对对乙酰氨基酚诱导小鼠急性肝损伤具有明显的改善作用, 见表 1。

2.2 诸葛菜种子水提物对对乙酰氨基酚致急性肝损伤小鼠血清中 ALT, AST, TBIL 的影响

AST 和 ALT 是检测肝功能最敏感的指标, 其活性的高低反映了肝脏受损的程度。正常状态时, AST 与 ALT 存在于肝细胞浆; 肝细胞受到损伤时, 二者则会从肝脏渗漏到血液中, 导致 AST 与 ALT 在血清中的浓度急剧上升。由表 2 可知, 与正常组相比, 模型组小鼠血清中 ALT、AST 活性分别上升了 7843.12%、1235.66%, TBIL 水平上升 82.00%, 表明 APAP 对小鼠肝脏造成了严重的损伤; 与模型组相比, 阳性药双环醇组 ALT, AST 活力分别下降了 4811.53%、462.00%, TBIL 水平下降了 16.10%; 阳性药葵花护肝片组 ALT、TBIL 分别下降了 35.85%、7.11%, 但是对 AST 的降低效果不明显; 而诸葛菜种子水提物各剂量组均能不同程度的降低小鼠血清中 ALT, AST 活性与 TBIL 水平, 中剂量组 ALT、AST 活性与模型组相比分别降低了 48.73%、59.11%, 高剂量组分别降低了 71.38%、59.33%, 此外, 高剂量组还能显著降低 TBIL 水平, 与模型组相比降低了 22.46%。由实验结果可知, 虽然诸葛菜种子水提物中、高剂量组对 ALT、AST 活性降低效果不及阳性药双环醇, 但远比葵花护肝片的降低效果明显, 表明诸葛菜种子水提物对模型组小鼠的肝功能有显著的改善作用。

表 2 诸葛菜提取物对血清中 ALT, AST 和 TBIL 的影响

Table 2 Effect of water extracts of *Orychophragmus violaceus* seeds on serum ALT, AST and TBIL activities ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(mg/kg)	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	TBIL/(U/L)
正常组	-	30.31±4.71	143.15±22.87	2.32±0.42
模型组	-	2407.56±879.47 ^{###}	1909.98±586.93 ^{###}	4.23±0.51 ^{###}
双环醇	200	49.35±8.03 ^{***}	340.32±143.87 ^{***}	3.55±0.96 [*]
葵花护肝片	350	1544.28±226.91 ^{***}	2334.63±291.4	3.93±0.26
诸葛菜提取物	125	1578.46±371.74 ^{***}	1491.71±356.76 ^{**}	3.67±1.01
	250	1234.82±329.73 ^{***}	781.26±351.88 ^{***}	3.62±0.63
	500	689.08±380.57 ^{***}	776.77±26.84 ^{***}	3.29±0.65 ^{**}

2.3 诸葛菜种子水提物对对乙酰氨基酚致急性肝损伤小鼠肝脏中 SOD, MDA, GSH 的影响

肝脏是产生 GSH 主要脏器, 当 APAP 过量时, 过多的 NAPQI 的产生会耗尽 GSH, 而 GSH 的耗竭会影响肝脏的正常功能^[12]。MDA 是一种很好的脂质过氧化程度的生物标志物, 其含量的高低反映 APAP 对小

鼠肝脏的损伤程度。结果见表 3。与正常组相比,模型组小鼠肝组织匀浆中 SOD 的活性与 GSH 的含量分别下降了 14.31%、51.90%,MDA 含量上升了 64.10%,说明对乙酰氨基酚对小鼠肝脏造成了严重的氧化损伤;与模型组比较,阳性药双环醇组 GSH 升高了 171.47%,MDA 的含量降低了 31.25%,对 SOD 活性升高效果不明显;阳性药葵花护肝片组 SOD 升高了 19.96%,MDA 降低了 28.13%,但是对 GSH 升高效果不明显;而诸葛菜种子水提取物中、高剂量组 SOD

和 GSH 升高效果明显,中剂量组 SOD 和 GSH 与模型组相比分别上升了 45.05%、219.45%,高剂量组 SOD 和 GSH 分别上升了 48.68%和 232.80%,此外,高剂量组能显著降低 MDA 水平,与模型组相比降低了 29.69%。由实验结果可知诸葛菜种子水提取物中、高剂量组 SOD 和 GSH 升高效果比阳性药双环醇组和葵花护肝片组明显。说明诸葛菜种子水提取物能显著提高小鼠的抗氧化能力。

表 3 诸葛菜种子水提取物对对乙酰氨基酚致小鼠肝损伤的肝组织匀浆中 SOD 活性及 MDA、GSH 含量的影响

Table 3 Effect of water extracts of *Orychophragmus violaceus* seeds on the levels of SOD and MDA and GSH in liver induced by APAP

(x±s, n=8)				
组别	剂量/(mg/kg)	SOD/(U/mg prot)	GSH/(μmol/g prot)	MDA/(nmol/mg prot)
正常组	-	58.93±8.16	173.86±47.15	0.39±0.12
模型组	-	50.66±5.72 [#]	83.64±29.93 [#]	0.64±0.27 ^{####}
双环醇	200	50.68±3.34	227.06±49.38 ^{***}	0.44±0.04 ^{**}
葵花护肝片	350	60.77±10.53 ^{**}	52.67±13.38	0.46±0.06 [*]
诸葛菜提取物	125	61.74±3.22 ^{**}	64.75±21.23	0.58±0.06
	250	73.5±5.75 ^{***}	267.19±113.58 ^{***}	0.51±0.09
	500	75.32±5.86 ^{***}	278.35±145.47 ^{***}	0.45±0.13 ^{**}

2.4 诸葛菜种子水提取物对对乙酰氨基酚致肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响

注: A: 正常组; B: 模型组; C: 双环醇阳性组; D: 葵花护肝片阳性组; E: 诸葛菜种子水提取物 125 mg/kg 组; F: 诸葛菜种子水提取物 250 mg/kg 组; G: 诸葛菜种子水提取物 500 mg/kg 组(图 2、3、4 同)。

显微镜下观察结果见图 1。正常组动物肝脏组织的组织病理学分析显示,肝细胞形态正常,均匀分布,细胞核大而完整;对乙酰氨基酚模型组的小鼠肝细胞排列紊乱,出现明显的灶状坏死,并伴有较多炎性细胞浸润;诸葛菜种子水提取物各给药组肝脏组织坏死程度介于模型组与正常组之间。其中,诸葛菜种子水提取物高剂量组的小鼠肝细胞形态明显好转,炎性浸润及坏死细胞较模型组明显减少。

2.5 诸葛菜种子水提取物对小鼠肝组织中 p-AMPK、p-AKT、p-GSK-3β、p-JNK、Caspase-9、Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

为了探讨诸葛菜种子水提取物抑制 APAP 诱导肝细胞凋亡的机制,本研究检测了肝组织中 AMPK、AKT、GSK-3β、Caspase-9、Caspase-3、p-JNK、促凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达情况。线粒体氧化应激已被认为是 APAP 引起肝损伤的关键。氧化应激可

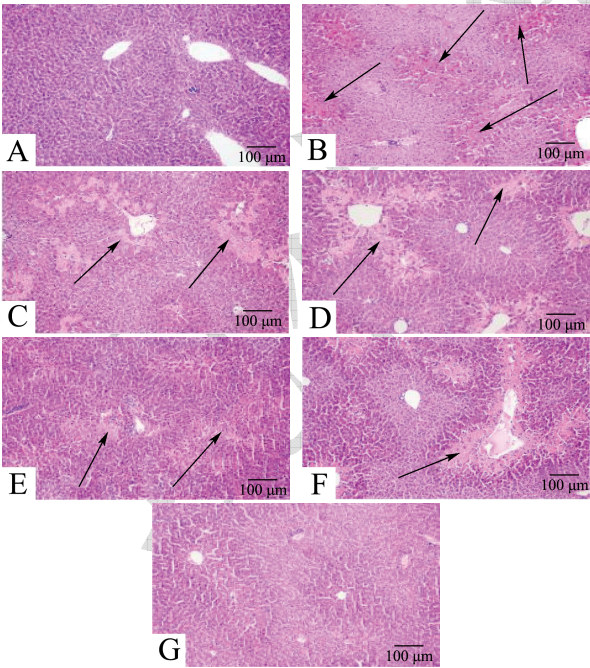


图 1 诸葛菜种子水提取物对对乙酰氨基酚致肝损伤小鼠肝组织病理学观察(×400)

Fig.1 Effect of water extracts of *Orychophragmus violaceus* seeds on liver histopathological features in liver injury model mice induced by APAP (×400)

导致细胞膜通透性增加,使凋亡诱导因子释放到细胞质,引发细胞凋亡,APAP 介导细胞凋亡的 Caspase 通路是其造成急性肝损伤的必要途径^[13]。3.2 AMPK 是细胞内行使能量代谢调节的蛋白激酶,参与糖、脂肪、蛋白质及细胞生长和凋亡等多种代谢过程^[14]。AKT 是 AMPK 重要的下游效应分子,当 AMPK 受到细胞外信号刺激发生磷酸化被激活时,信号转导至细胞膜,进而引起 AKT 膜电位转变而磷酸化, p-AKT 转入细胞内,促进 GSK-3 β 磷酸化,磷酸化了的 GSK-3 β 处于非活性状态,可抑制 Caspase-3 活化,从而抑制细胞凋亡,减少肝细胞损伤^{[[15-18]}。此外,研究表明过量 APAP 也可导致细胞质中 JNK 磷酸化, JNK 磷酸化后可调节 Bcl-2 家族的成员,加速细胞色素 C 从线粒体释放到细胞质,促进细胞凋亡^[19]。实验结果表明诸葛菜种子水提物可促进 AMPK、AKT、GSK-3 β 蛋白的磷酸化表达,使 AMPK/AKT/ GSK-3 β 通路被激活,抑制 Caspase-3 活化。此外,诸葛菜种子水提物也可抑制 JNK 磷酸化,使 Bcl-2 蛋白表达增加, Bax 蛋白表达下降,抑制 Caspase 家族的级联反应,进而抑制细胞凋亡^[20-22]。

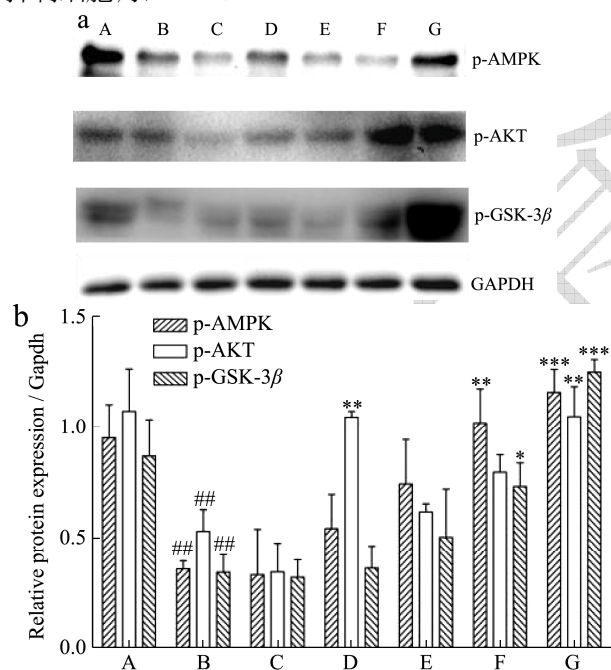


图2 诸葛菜种子水提物对小鼠肝组织中 p-AMPK、p-AKT、p-GSK-3 β 蛋白表达的影响

Fig.2 Effect of water extracts of *Orychophragmus violaceus* Seeds on the expression of p-AMPK, p-AKT, p-GSK-3 β in liver tissue of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

注: 与正常组比较# $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$; 与模型组比较* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ (图3, 4同)。

由图2可知, 诸葛菜种子水提物对 AMPK/AKT/p-GSK-3 β 信号通路发挥调控作用, 与正

常组相比, 模型组细胞中 p-AMPK、p-AKT 和 p-GSK-3 β 的蛋白表达量明显降低 ($p<0.001$); 与模型组比较, 诸葛菜种子水提物高剂量组显著提高 p-AMPK、p-AKT 和 p-GSK-3 β 的蛋白表达量 ($p<0.001$)。

凋亡相关蛋白表达结果见图3、4。模型组 Caspase-9、Caspase-3 蛋白的表达量明显高于正常组, 具有显著性差异 ($p<0.01$), 与模型组相比, 诸葛菜种子水提物高剂量组中 Caspase-9、Caspase-3 前体蛋白含量明显降低 ($p<0.01$), 表明二者被大量激活, 肝细胞发生凋亡。

由图4可知, 与正常组相比, 模型组 p-JNK 蛋白表达水平极显著升高 ($p<0.01$), 且 Bcl-2/Bax 的蛋白比值显著降低 ($p<0.01$), 表明过量的 APAP 可激活 JNK, 使其磷酸化增加, 进而激活凋亡通路相关蛋白, 促进细胞凋亡。而与模型组相比, 诸葛菜种子水提物高剂量组 p-JNK 蛋白表达显著降低 ($p<0.001$), Bcl-2/Bax 的蛋白比值极显著升高 ($p<0.001$)。由图3、4表明诸葛菜种子水提物可显著抑制 APAP 诱导的凋亡蛋白 Caspase-9、Caspase-3、p-JNK、Bax 表达量的增加以及 Bcl-2 表达的降低。这些结果表明诸葛菜种子水提物对 APAP 诱导肝损伤的保护作用可能是通过抑制细胞凋亡实现的。

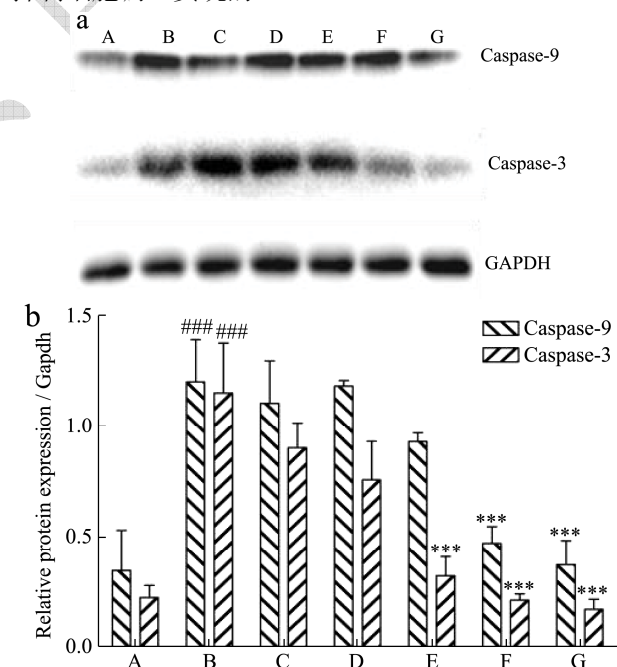


图3 诸葛菜种子水提物对小鼠肝组织中 Caspase-9、Caspase-3 蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of water extracts of *Orychophragmus violaceus* seeds on the expression of Caspase-9, Caspase-3 in liver tissue of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

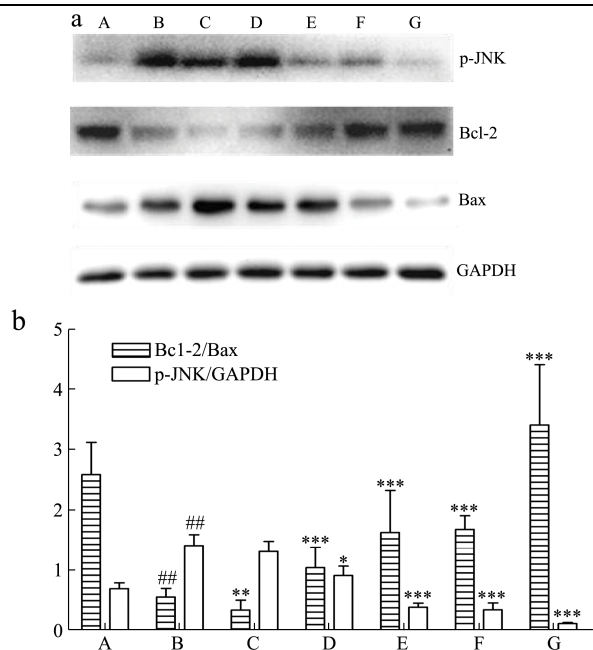


图4 诸葛菜种子水提取物对小鼠肝组织中 Bcl-2/Bax、p-JNK 蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of water extracts of *Orychophragmus violaceus* Seeds on the expression of p-JNK, Bax, Bcl-2 in liver tissue of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3 结论

综上所述, 诸葛菜种子水提取物可能是通过上调 AMPK 和 AKT 蛋白磷酸化水平, 激活 AMPK/AKT/GSK-3 β 信号通路, 从而上调下游 Bcl-2 蛋白的表达和下调 Bax、Caspase-3 蛋白的表达来抑制肝细胞的凋亡, 起到对 APAP 诱导肝损伤的保护作用, 其确切的分子机制还有待深入研究。

参考文献

- [1] An H R, Wu X Q. Antituberculosis drugs and hepatotoxicity [J]. Chin J Antibiotics, 2010, 35(10): 727-733
- [2] 乞振兰, 王梓, 李伟, 等. 人参果花青素对乙酰氨基酚致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 中草药, 2017, 48(13): 2704-2710
QI Zhen-lan, WANG Zi, LI Wei, et al. Protective effect of ginseng fruit anthocyanin on acetaminophen induced liver injury in mice [J]. Chinese Herbal Medicine, 2017, 48(13): 2704-2710
- [3] 申振宇, 王玉, 陈易斯, 等. 对乙酰氨基酚诱导小鼠急性肝损伤中 p62-keap1-Nrf2 信号通路变化[J]. 毒理学杂志, 2017, 31(6): 442-446
SHEN Zhen-yu, WANG Yu, CHE Yi-si, et al. The change of p62-keap1-Nrf2 signal pathway in acetaminophen-induced acute liver injury in mice [J]. Journal of Toxicology, 2017,

31(6): 442-446

- [4] 马霞, 梅燕. 诸葛菜的研究现状与开发应用前景[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(9): 5109-5111, 5113
MA Mi-xia, MEI Yan. Research status and development and application prospect of Zhuge cuisine [J]. Anhui Agricultural Science, 2012, 40(9): 5109-5111, 5113
- [5] 张婷婷, 马国需, 许福泉, 等. 诸葛菜水溶性化学成分的研究[J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(24): 2165-2167
ZHANG Ting-ting, MA Guo-xu, XU Fu-quan, et al. Study on the water-soluble chemical constituents of zhugecai [J]. Chinese Journal of Pharmacy, 2014, 49(24): 2165-2167
- [6] 刘晨琪. 诸葛菜种子水提取物对肝损伤的保护作用及分子机制的研究[D]. 黑龙江: 哈尔滨商业大学, 2017
LIU Chen-qi. Study on the protective effect and molecular mechanism of water extracts of *Orychophragmus violaceus* seeds on liver injury [D]. Heilongjiang: Harbin Business University, 2017
- [7] 杨华蕊, 徐妍, 杨永寿, 等. 天然产物抗肝纤维化作用及其机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(14): 214-221
YANG Hua-rui, XU Yan, YANG Yong-shou, et al. Research progress on the anti-fibrosis effect of natural products and its mechanism [J]. Chinese Journal of Experimental Pharmacology, 2018, 24(14): 214-221
- [8] Xiaowei H, Chenqi L, Li G, et al. Hepatoprotective effect of aqueous extract from the seeds of *Orychophragmus violaceus* against liver injury in mice and HepG2 cells [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(6): 1197
- [9] 刘晨琪, 高丽, 霍小位, 等. 诸葛菜种子水提取物对急性酒精肝损伤小鼠的保护作用[J]. 现代食品科技, 2017, 33(8): 7-11, 79
LIU Chen-qi, GAO Li, HUO Xiao-wei, et al. The protective effect of water extracts of *Orychophragmus violaceus* seeds on mice with acute alcoholic liver injury [J]. Modern Food and Technology, 2017, 33(8): 7-11, 79
- [10] 郑册, 聂燕, 卓蕴慧. 对乙酰氨基酚小鼠肝衰竭模型的研究进展[J]. 肝脏, 2015, 20(11): 896-898
ZHENG Ce, NIE Yan, ZHUO Yun-hui. Research progress of acetaminophen induced liver failure in mice [J]. Liver, 2015, 20(11): 896-898
- [11] 何银, 刘春雨, 何迟迟, 等. 扶正养肝合剂对药物性肝损伤的保护作用研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(23): 4685-4691
HE Yin, LIU Chun-yu, HE Chi-chi, et al. Study on the protective effect of Fuzheng Yanggan mixture on drug-induced liver injury [J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018, 43(23): 4685-4691
- [12] 汪倩, 徐瑞娟, 杨劲. 对乙酰氨基酚肝毒性机理及药物干预

- 靶点[J].药学与临床研究,2011,19(3):247-252
- WANG Qian, XU Rui-juan, YANG Jin. Hepatotoxicity mechanism and drug intervention target of paracetamol [J]. Pharmaceutical and Clinical Research, 2011, 19(3): 247-252
- [13] HJ B, Y M L, T H K, et al. Caspase-3/7-mediated cleavage of β_2 spectrin is required for acetaminophen-induced liver damage [J]. International Journal of Biological Sciences, 2016, 12(2): 172-183
- [14] 韦乃球,郝二伟,覃骊兰,等.白子菜对胰岛素抵抗大鼠 AMPK/Akt 信号通路的影响[J].中药材,2019,42(2):418-421
- WEI Nai-qi, HAO Er-wei, QIN Li-lan, et al. Effect of baizicai on AMPK/Akt signaling pathway in insulin resistant rats [J]. Chinese Materia Medica, 2019, 42(2): 418-421
- [15] Zheng T, Yang X Y, Wu D, et al. Salidroside ameliorates insulin resistance through activation of a mitochondria-associated AMPK/PI3K/Akt/GSK3 β pathway [J]. British Journal of Pharmacology, 2015, 172: 3284-3301
- [16] Choi S H, Kim Y W, Kim S G. AMPK-mediated GSK3 β inhibition by isoliquiritigenin contributes to protecting mitochondria against iron-catalyzed oxidative stress [J]. Biochemical Pharmacology, 2010, 79: 1352-1362
- [17] Zhang W Q, Cui Y, Gao j L, et al. Recombinant osteopontin improves neurological functional recovery and protects against apoptosis via PI3K/Akt/GSK-3 β pathway following intracerebral hemorrhage [J]. Medical Science Monitor, 2018, 24: 1588-1596
- [18] 赵培,叶杰,闫晓风,等.麦角甾醇通过 PI3K/Akt/GSK3 β 通路抑制 H₂O₂ 诱导的小鼠胚胎肝细胞凋亡[J].中国细胞生物学学报,2017,39(1): 13-20
- ZHAO Pei, YE Jie, YAN Xiao-feng, et al. Ergosterol inhibits apoptosis of mouse fetal hepatocytes induced by H₂O₂ through PI3K/Akt/GSK3 β pathway [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2017, 39(1): 13-20
- [19] Saito C, Zwingmann C, Jaeschke H. Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine [J]. Hepatology, 2010, 51: 246-254
- [20] 车金营,杨硕,乔子敬,等.五味子多糖对乙酰氨基酚诱导的小鼠肝细胞凋亡的影响[J].食品工业科技,2019,40(16): 285-289,303
- CHE Jin-ying, YANG Shuo, QIAO Zi-jing, et al. Effect of *Schisandra* polysaccharide on acetaminophen induced apoptosis of mouse hepatocytes [J]. Food Industry Technology, 2019, 40(16): 285-289, 303
- [21] Wang Z, Hu J, Yan M, et al. Caspase-mediated anti-apoptotic effect of Rg5, a main rare ginsenoside on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(42): 9226-9236
- [22] 马燕花,师霞,邱晓青,等.慈姑消脂丸对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝组织中 p-JNK/p-c-Jun 信号通路表达的影响[J].中药材,2017,40(12):2950-2955
- MA Yan-hua, SHI Xia, QIU Xiao-qing, et al. Effect of Cigu Xiaozhi Pill on the expression of p-JNK/p-c-jun signal pathway in liver tissue of rats with nonalcoholic steatohepatitis [J]. Traditional Chinese Medicine, 2017, 40(12): 2950-2955

(上接第 141 页)

- [26] 汪新颖,王波,侯松涛,等.苹果酸脱氢酶的结构及功能[J].生物化学杂志,2009,4:71-74
- WANG Xin-ying, WANG Bo, HOU Song-tao, et al. Structure and function of malate dehydrogenase [J]. Journal of Biology, 2009, 4: 71-74
- [27] Yoshida K, Hisabori T. Adenine nucleotide-dependent and redox-independent control of mitochondrial malate dehydrogenase activity in *Arabidopsis thaliana* [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2016, 1857(6): 810-818
- [28] Huang J, Niazi A K, Young D, et al. Self-protection of cytosolic malate dehydrogenase against oxidative stress in *Arabidopsis* [J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 69(14): 3491-3505
- [29] Silvius J E, Ingle M, Baer C H. Sulfur dioxide inhibition of photosynthesis in isolated spinach chloroplasts [J]. Plant Physiology, 1975, 56(3): 434-437
- [30] 朱碧云,李浩明.丙酮酸脱羧酶及其应用研究[J].生命科学,2010,11:108-115
- ZHU Bi-yun, LI Hao-ming. Reviews on pyruvate decarboxylase and its application [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2010, 11: 108-115