

基于 Nrf2 和 NLRP3 探讨辣木籽提取物对慢性酒精性肝损伤小鼠肝脏的保护作用

李晨雯, 柏珺, 赵力, 杨思昱, 罗雅俊, 张青碧*

(西南医科大学公共卫生学院, 环境健康效应及风险评估泸州市重点实验室, 四川泸州 646000)

摘要: 该研究探讨了辣木籽提取物通过调控核转录 NF-E2 相关因子 2 (Nuclear Factor Crythroid-related Factor 2, Nrf2) 和核苷酸结合寡聚化合物结构域样受体 3 (NACHT-LRR-PYD-containing Proteins 3 Inflammasome, NLRP3) 通路减轻小鼠慢性酒精性肝损伤的作用机制。通过酒精液体饲料建立慢性酒精性肝损伤模型, 干预组在酒精液体饲料喂养的同时用不同浓度辣木籽提取物灌胃, 检测天冬氨酸氨基转移酶 (Aspartate Aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶 (Alanine Aminotransferase, ALT)、白细胞介素-18 (Interleukin-18, IL-18)、白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 和超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 含量, 观察小鼠肝脏病理学改变, 检测 Nrf2、HO-1、NLRP3 和 Caspase-1 的蛋白表达水平。结果表明, 在辣木籽提取物的作用下, 慢性酒精性肝损伤小鼠血清的 AST 和 ALT 最高分别下降至 71.68 U/L、46.84 U/L ($P<0.05$), 炎症因子 IL-18 及 IL-1 β 含量下降; 肝脏中 GSH 及 SOD 含量升高, MDA 含量减少, Nrf2 及 HO-1 表达升高, NLRP3 及 Caspase-1 表达降低。提示辣木籽提取物通过 Nrf2/HO-1 和 NLRP3/Caspase-1 信号通路起到抗氧化及抑制炎症作用, 从而减轻小鼠慢性酒精性肝损伤。

关键词: 辣木籽; 慢性酒精性肝损伤; 氧化应激; 炎症

文章编号: 1673-9078(2023)10-51-58

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.10.1492

Protective Effect of *Moringa oleifera* Seed Extract in a Chronic Alcoholic Liver Injury Murine Model Based on NRF2 and NLRP3

LI Chenwen, BAI Jun, ZHAO Li, YANG Siyu, LUO Yajun, ZHANG Qingbi*

(Environmental Health Effects and Risk Assessment Key Laboratory of Luzhou, School of Public Health, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

Abstract: The mechanism underlying the ability of *Moringa oleifera* seed extract to reduce chronic alcoholic liver injury in mice was analyzed. The chronic alcoholic liver injury model was established by providing liquid alcohol feed to mice. The intervention group was also administered different concentrations of horseradish seed extract via oral gavage. Subsequently, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), interleukin-18 (IL-18), interleukin-1 β (IL-1 β), malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH), and superoxide dismutase (SOD) contents were measured to assess the pathological changes in the mouse liver. Moreover, the expression of specific proteins, namely, nuclear factor crystalloid-related factor 2 (NRF2), HO-1, nucleotide binding oligomeric domain like receptor 3 (NLRP3), and caspase-1 were measured. The results showed that serum AST and ALT levels in the mice with chronic alcoholic liver injury decreased to 71.68 U/L and 46.84 U/L respectively ($P<0.05$) following the administration of *M. oleifera* seed extract. Following treatment, the abundance of inflammatory

引文格式:

李晨雯, 柏珺, 赵力, 等. 基于 Nrf2 和 NLRP3 探讨辣木籽提取物对慢性酒精性肝损伤小鼠肝脏的保护作用[J]. 现代食品科技, 2023, 39(10):51-58

LI Chenwen, BAI Jun, ZHAO Li, et al. Protective effect of *Moringa oleifera* seed extract in a chronic alcoholic liver injury murine model based on NRF2 and NLRP3 [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(10): 51-58

收稿日期: 2022-11-23

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目 (202010632056)

作者简介: 李晨雯 (1996-), 女, 硕士, 研究方向: 职业与环境因素效应, E-mail: 3331617507@qq.com

通讯作者: 张青碧 (1968-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 职业与环境因素效应, E-mail: qingbizhang@126.com

factors (IL-18 and IL-1 β) decreased, whereas the GSH and SOD levels increased in the liver. Moreover, MDA content and NLRP3 and caspase-1 abundance decreased, whereas the expression of NRF2 and HO-1 increased. These findings suggest that *M. oleifera* seed extract elicits antioxidant and anti-inflammatory effects through the NRF2/HO-1 and NLRP3/caspase-1 signaling pathways.

Key words: *Moringa oleifera* seeds; chronic alcoholic liver injury; oxidative stress; inflammation

酒精所造成的疾病是世界各国都重视的公共卫生问题,我国归因于饮酒的疾病负担仍旧沉重,2019年因饮酒致死的人数是1990年的1.44倍,且饮酒是我国居民死亡的第三位危险因素^[1],长期饮酒会引起机体代谢失衡,甚至酒精中毒。研究表明,长期饮酒可通过氧化应激和炎症反应导致肝脏损伤^[2]。虽然药物可以缓解酒精毒性,但也会对机体造成一定副作用^[3]。因此,探讨天然植物提取物缓解酒精毒性的作用成为了研究热点^[4]。

辣木(*Moringa oleifera*)是辣木属多年生热带落叶乔木,因生长快速、富有营养且功能多样而具有很高的经济价值,被称为“奇迹之树”。已有研究发现辣木籽具有抗氧化、保肝护肝、抗炎、抗醉等多种作用^[5-7]。药理学研究表明,辣木籽提取物能够促进体内酒精代谢,在减少酒精吸收的同时提高乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶的活性^[8],从源头上减少酒精的伤害。体外研究发现辣木籽在抗氧化方面有一定应用前景^[9],同时其具有抗炎、保肝等作用,从机制上分析其对慢性酒精性肝损伤可能具有良好的疗效。目前在对于辣木籽提取物的研究中,有研究提示辣木籽提取物可有效缓解酒精所致的线虫运动障碍^[3],另外,辣木籽对酒精和四氯化碳诱导的小鼠急性肝损伤有缓解作用^[10]。但目前辣木籽提取物对慢性酒精性肝损伤的缓解作用机制仍不清楚。

核转录 NF-E2 相关因子 2 (Nuclear Factor Crythroid-related Factor 2, Nrf2) 是抗氧化体系上游的重要调控转录因子,调控着上百种抗氧化相关蛋白的转录表达^[11]。许多天然药物可通过调控 Nrf2 来保护肝细胞免受酒精所致的氧化损伤^[12,13],有研究表明辣木籽可激活 Nrf2 及其下游转录因子血红素加氧酶 1 (HemeOxygenase 1, HO-1)^[14],提示辣木籽可能通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路激活机体的氧化防御系统。而炎症小体是位于细胞内的多蛋白复合体,参与机体的炎症反应,而炎症小体的核心成分为核苷酸结合寡聚化合物结构域样受体 (Nucleotide-binding Oligomerization Domain Like Receptors, NLRPs) 家族蛋白,核苷酸结合寡聚化合物结构域样受体 3 (NACHT-LRR-PYD-containing Proteins 3 Inflammasome, NLRP3) 是 NLRPs 家族中的一员,具有启动炎症反应的作用^[15]。研究表明,酒精性肝损

伤患者的肝脏样本中 NLRP3 表达增加^[16],提示 NLRP3 可能与酒精性肝病的发生发展存在关联。有研究证实,辣木籽可减少阿霉素介导的心脏毒性临床前模型的促炎生物标志物如 NLRP3^[17]。这一结果提示辣木籽可通过抑制 NLRP3 的表达进而抑制炎症的发生。因此我们推测,辣木籽可能通过调节 Nrf2 及 NLRP3 的表达来缓解酒精所致的慢性肝损伤。本实验使用乙醇热浸法对辣木籽进行提取并将提取物用于慢性酒精性肝损伤小鼠,探索辣木籽提取物通过调节 Nrf2 及 NLRP3 对慢性酒精性肝损伤的影响,为辣木籽缓解慢性酒精性肝损伤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物由西南医科大学实验动物中心提供(实验动物生产许可证号:SYXK(川)2018-065),为6~8周龄 Balb/C 小鼠,体质量(20 $\pm$ 2)g,动物饲养温度(23 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,湿度50% $\pm$ 5%。

1.2 药品与试剂

辣木籽,云南省昆明市;无水乙醇,成都市科隆化学品有限公司;Lieber-DeCarli 酒精液体模型饲料[TP4032,饲料配比(质量分数):脂肪12%,蛋白质18%,碳水化合物34%,酒精36%];Lieber-DeCarli 酒精液体对照饲料[TP4032C,饲料配比(质量分数):脂肪12%,蛋白质18%,碳水化合物70%];南通特洛菲饲料有限公司;丙氨酸氨基转移酶(Alanine Aminotransferase, ALT)试剂盒、天门冬氨酸氨基转移酶(Aspartate Aminotransferase, AST)试剂盒、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)试剂盒、还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)和超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)试剂盒,上海桥社生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 辣木籽提取物的制备

辣木籽提取物的获取参考汤兴楠等^[18]研究,选择乙醇热浸法,该方法辣木籽生物活性物质的提取率较高,包括总苷、总黄酮和总酚。该提取方法的最佳工艺条件:将干燥辣木籽研磨为粉末后过筛,用体积分

数 70% 的乙醇溶液按 1:30 g/mL 料液比, 70 °C 加热提取, 提取时间为 2 h, 提取 2 次, 用真空滤膜泵过滤提取物后, 使用旋转蒸发器 50 °C 真空浓缩过滤液, 最后将浓缩液冷冻真空干燥后获得固体提取物。用蒸馏水将终产物分别配制成 5、10、15 mg/mL 的溶液, 于 4 °C 冰箱保存待用。

1.3.2 Lieber-DeCarli 酒精液体饲料动物模型的建立

参考初君怡^[16]的研究构建小鼠慢性酒精性肝损伤模型。将 60 只小鼠随机分为以下 6 组: A: 空白对照组 (CON group); B: 高剂量辣木籽提取物 (15 mg/mL) 对照组 (HMo-CON group); C: Lieber-DeCarli 酒精液体饲料组 (酒精造模组, L-D group); D: 低剂量辣木籽提取物 (5 mg/mL) 酒精造模组 (LMO group); E: 中剂量辣木籽提取物 (10 mg/mL) 酒精造模组 (MMo group); F: 高剂量辣木籽提取物 (15 mg/mL) 酒精造模组 (HMo group)。A、B 组用不含酒精的液体饲料喂养, C、D、E、F 组用等体积 Lieber-DeCarli 酒精液体饲料喂养, 同时, B、F 组用 15 mg/mL 辣木籽提取物按每天 10 mL/kg 灌胃, D 组用 10 mg/mL 辣木籽提取物按每天 10 mL/kg 灌胃, E 组用 5 mg/mL 辣木籽提取物按每天 10 mL/kg 灌胃。连续喂养小鼠 8 周, 模拟慢性酒精性肝损伤模型, 8 周末处死小鼠。

1.3.3 血清学指标检测

1%戊巴比妥钠麻醉小鼠后采用眼球静脉取血方式收集小鼠血液, 将收集的血液置于 2 mL 离心管中, 血样静置 30 min 后, 4 000 r/min 离心 15 min 后, 取上清液并根据试剂盒说明书测定血清中 AST、ALT 及炎症因子 IL-18、IL-1 β 的含量。

1.3.4 肝脏组织形态学观察

取血后处死小鼠, 剥离肝脏, 将肝脏用冰生理盐水漂洗、滤纸吸干水后, 切取 1 cm³ 的肝脏组织, 用滤纸吸干血水, 福尔马林缓冲液固定, 石蜡包埋后切片, 经苏木精-伊红染色法 (Hematoxylin-Eosin Staining, HE), 光镜下观察肝组织的病理学改变。

1.3.5 肝脏中 MDA、GSH 和 SOD 的检测

将 1.3.4 中剩余肝脏组织分装于 -80 °C 保存备用。分装各组肝脏组织称取 1 g 放入玻璃匀浆管口剪碎, 加入 9 倍体积冷生理盐水。低温状态下将肝脏组织充分研碎使组织匀浆化, 低温离心机离心 3 000 r/min 离心 15 min 取上清液, 按试剂盒说明书进行操作测定 MDA、GSH 和 SOD 的含量。

1.3.6 Western blot 检测肝脏中蛋白表达水平

称取适量分装的小鼠肝脏组织, 加入 4 °C 裂解缓冲液提取总蛋白。使用 BCA 蛋白测定试剂盒进行蛋

白浓度测定。将各样品蛋白浓度调整至一致后, 将等量蛋白加入提前配好的 SDS-PAGE 凝胶上进行电泳, 电泳完成后进行湿转恒流转膜, 使蛋白转至 PVDF 膜上, 将 PVDF 膜浸入封闭液封闭 90 min, 封闭完成后将 PVDF 膜放在加入相应抗体的一抗稀释液中, 37 °C 恒温滴膜孵育 2 h 或 4 °C 过夜。一抗孵育完后用 TBST 清洗 4 次, 每次 5 min; 清洗完后将 PVDF 膜放在二抗稀释液中, 37 °C 恒温滴膜孵育 1 h; 孵育完后用 TBST 清洗 4 次, 每次 5 min; 将 PVDF 膜浸泡于 ECL 发光液中, 在凝胶成像系统中进行曝光。

1.4 统计学分析

所有数据采用 SPSS 26.0 统计分析, 计量数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 多组间比较采用重复测量资料的方差分析和单因素方差分析, 分析后两两比较采用 LSD-t 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 辣木籽提取物对慢性酒精性肝损伤小鼠肝脏功能的影响

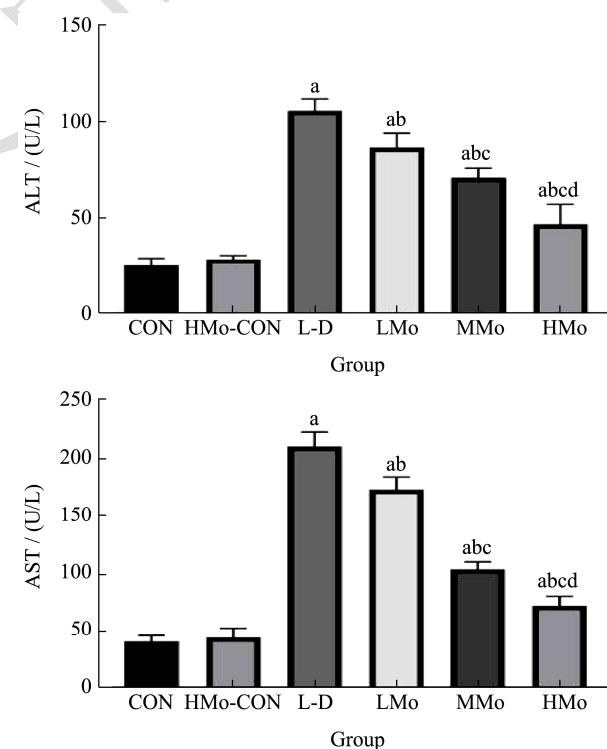


图1 各组血清 ALT 及 AST 含量

Fig.1 Contents of ALT and AST in serum of each group

注: a 表示与 CON group 比较差异显著, $P<0.05$; b 表示与 L-D group 比较差异显著, $P<0.05$; c 表示与 LMO group 比较差异显著, $P<0.05$; d 表示与 MMo group 比较差异显著, $P<0.05$ 。

随着肝细胞的破坏,肝损伤会导致血清学指标的明显改变,慢性酒精性肝损伤常表现为肝细胞坏死和各种肝功能损伤指标均明显高于正常动物。梁华峰等^[19]的研究表明,采用血清 AST、ALT、MDA、 γ -GT、肿瘤坏死因子 TNF- α 、IL-1 β 能较为可靠的反映肝功能的变化。AST 和 ALT 是临床评估肝功能是否损伤的常用指标^[20],在酒精性肝损伤的相关研究中可发现,酒精干预组均会引起模型动物血清中 AST 及 ALT 的显著升高^[8,21],表明酒精会造成动物出现一定程度的肝损伤。而在本研究中,通过小鼠血清学检测结果发现(图 1),与对照组相比,高剂量辣木籽提取物对照组 ALT 及 AST 无明显变化,表明在无酒精影响的情况下,辣木籽提取物对大鼠的肝功能影响不大;而 Lieber-DeCarli 酒精液体饲料组的 ALT 及 AST 的表达显著升高,ALT 的表达增高至 105.77 U/L,AST 的表达增长至 210.37 U/L;与酒精造模组相比,给予不同浓度辣木籽提取物处理的酒精液体饲料喂食小鼠的血清中 ALT 及 AST 含量显著降低,并与辣木籽提取物的浓度呈现剂量—效应关系,而高剂量的辣木籽提取物处理的酒精造模组的 ALT 及 AST 分别降至 46.84 U/L 和 71.68 U/L。这些结果提示辣木籽提取物能降低慢性酒

精性肝损伤小鼠血清中 ALT 及 AST 的含量。

3.2 辣木籽提取物对慢性酒精性肝损伤小鼠

肝脏质量及肝脏指数的影响

为进一步判断酒精对肝脏的损伤程度及辣木籽是否具有保肝护肝作用,我们对小鼠体质量及肝脏进行称量并计算肝脏指数。

$$L = \frac{m}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

L ——肝脏指数, %;

m ——肝脏质量, g;

m_0 ——小鼠体质量, g。

如表 1 所示,与对照组相比,慢性酒精暴露的小鼠体质量明显减轻,但肝脏质量和肝脏指数明显增加。辣木籽提取物干预可明显降低小鼠的肝脏指数,与 Lieber-DeCarli 酒精液体饲料组相比,辣木籽提取物中剂量和高剂量组小鼠的肝脏质量指数分别降低了 10.70% 和 23.20%。这一结果提示了辣木籽提取物可减轻酒精所致的小鼠慢性肝损伤。

表 1 各组小鼠肝脏质量和肝脏指数

Table 1 Liver weight and liver index of mice in each group

组别	初体质量/g	终体质量/g	肝脏质量/g	肝脏指数/%
CON	18.20±1.20	25.50±1.30	1.10±0.10	4.30±0.50
HMo-CON	18.10±1.10	25.20±1.50	1.08±0.20	4.20±0.70
L-D	18.50±1.30	23.20±1.70 ^a	1.30±0.20 ^a	5.60±0.50 ^a
LMO	18.40±1.40	23.80±2.10 ^a	1.28±0.40 ^a	5.30±0.70 ^a
MMo	18.30±1.20	24.40±1.50 ^{abc}	1.22±0.30 ^{ab}	5.00±0.60 ^{abc}
HMo	18.20±1.30	24.80±1.40 ^{abc}	1.19±0.20 ^{abcd}	4.70±0.60 ^{abcd}

注: a 表示与 CON group 比较差异显著, $P < 0.05$; b 表示与 L-D group 比较差异显著, $P < 0.05$; c 表示与 LMO group 比较差异显著, $P < 0.05$; d 表示与 MMo group 比较差异显著, $P < 0.05$ 。

3.3 辣木籽提取物对慢性酒精性肝损伤小鼠

肝脏病理形态学的影响

为进一步判断酒精造模是否成功并确定辣木籽提取物对酒精造成的肝损伤有抑制作用,我们将肝脏组织进行了 HE 染色并观察其病理学变化。根据图 2 的 HE 染色结果显示,对照组和高剂量辣木籽提取物对照组的小鼠肝细胞排列整齐、大小均一,细胞核呈圆形,界限清晰,分布在肝细胞中央,肝小叶结构正常。Lieber-DeCarli 酒精液体饲料组肝细胞排列紊乱,

细胞质疏松、肿胀,嗜酸性下降,细胞核固缩,形态不一,小静脉周围可见大量点状或片状坏死,肝细胞索排列紊乱,肝细胞内呈现明显空泡状。这一结果结合血清学指标和肝脏指数的变化,提示采用本方法构建慢性酒精性肝损伤小鼠模型成功。而在造模成功的慢性酒精性肝损伤大鼠肝组织中,辣木籽提取物随着剂量的增加呈现剂量依赖性的肝保护作用,对酒精所致的肝细胞脂肪变性、炎性浸润及坏死有不同程度的减轻。这一结果与张蕾等^[10]的研究结果类似,提示辣木籽提取物在一定程度上抵抗长期摄入酒精所致的肝损伤。

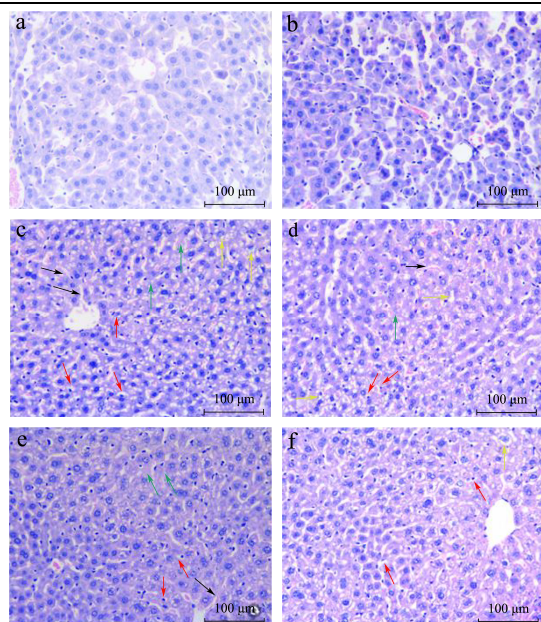


图2 各组小鼠肝组织 HE 染色图片

Fig.2 HE staining pictures of liver tissues of mice in each group

注: a 为 CON group; b 为 HMo-CON group; c 为 L-D group; d 为 LMo group; e 为 MMo group; f 为 HMo group。黑色箭头表示肝索紊乱; 绿色箭头表示肝细胞坏死; 红色箭头表示脂肪病变; 黄色箭头表示水肿。

3.4 辣木籽提取物对慢性酒精性肝损伤小鼠肝脏氧化应激指标的影响

慢性酒精性肝损伤主要是由于乙醇在人体内的代谢产生有害的活性氧 (ROS) 等活性分子引发氧化应激, 抑制肝细胞的抗氧化能力并通过增加脂质过氧化物的形成, 使肝组织得不到足够的氧导致肝细胞死亡, 此外乙醇的代谢物乙醛也会通过脂质的过氧化与蛋白质的共价结合而对肝产生毒害作用导致肝细胞死亡^[22]。丙二醛 (MDA) 作为体内脂质过氧化的主要终产物, 其水平反映机体脂质过氧化程度, 可间接判断细胞受自由基攻击的严重程度; 超氧化物歧化酶 (SOD) 活力反映机体清除自由基能力; 还原型谷胱甘肽 (GSH) 主要作用是清除自由基, 防止脂质过氧化反应发生, 其水平也是衡量机体抗氧化能力的重要因素^[23]。酒精可以导致 SOD、GSH 等抗氧化物质减少, 进而导致 MDA 的增加^[4], 这一现象证明了氧化应激可能是酒精造成肝脏损伤的重要因素。本实验的研究结果表明 (图 3), 与对照组相比, 给予酒精饮料进行慢性酒精性肝损伤造模后, 小鼠肝脏中 SOD 和 GSH 的含量显著降低, 而 MDA 含量显著升高; 而同时给予不同剂量辣木籽提取物后, SOD 和 GSH 的含量较模型组均有不同程度的升高, MDA 有不同程度

的降低。提示辣木籽提取物能调节慢性酒精性肝损伤模型小鼠肝脏中的氧化应激反应, 起到抗氧化作用, 减轻酒精引起的氧化损伤。

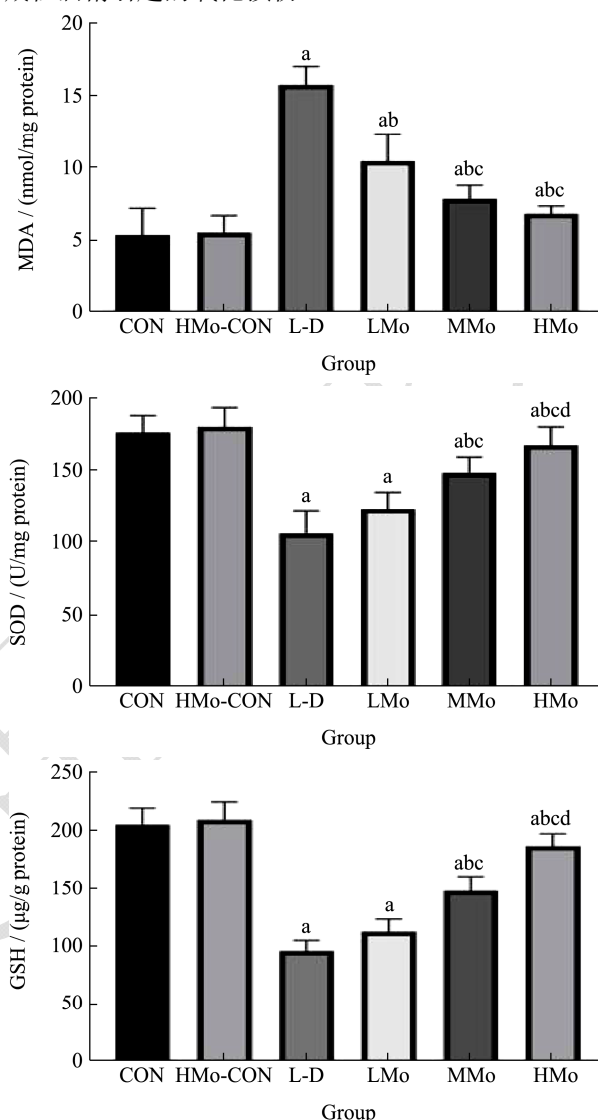


图3 各组肝脏 MDA、SOD 和 GSH 含量

Fig.3 Contents of MDA, SOD and GSH in liver of each group

注: a 表示与 CON group 比较差异显著, $P < 0.05$; b 表示与 L-D group 比较差异显著, $P < 0.05$; c 表示与 LMo group 比较差异显著, $P < 0.05$; d 表示与 MMo group 比较差异显著, $P < 0.05$ 。

3.5 辣木籽提取物对慢性酒精性肝损伤小鼠肝脏炎症因子表达的影响

炎症在肝损伤中发挥重要作用, 而酒精的代谢产物会增加肿瘤坏死因子、白介素 IL-1、IL-6、IL-10 等炎症因子的产生进而影响甘油三酯的转运而引起脂代谢紊乱^[24], 进而加重肝损伤。有研究证实, 长期饮酒后, 肝细胞会合成大量炎症因子, 进而导致肝细胞凋亡^[25]。在关于肝脏疾病的研究中发现, IL-18 是重要

的促炎因子和免疫调节因子,同时 IL-1 β 能够诱导肝细胞产生众多细胞因子,加速肝细胞凋亡,进一步加重肝细胞炎症反应,使肝细胞清理炎症因子和内毒素的能力下降^[26]。因此,选择 IL-18 和 IL-1 β 这两个代表性的炎症因子进行检测。如图 4 所示,与对照组相比, Lieber-DeCarli 酒精液体饲料组的小鼠血清中 IL-18 和 IL-1 β 的含量显著增加至 105.77 pg/mL 和 125.77 pg/mL,与对照组相比呈明显增加 ($P<0.05$)。不同浓度的辣木籽提取物能够有效降低酒精引起的 IL-18 和 IL-1 β 水平的升高,高剂量辣木籽提取物灌胃治疗后分别降低至 56.84 pg/mL 和 52.84 pg/mL,与酒精造模组相比具有显著差异 ($P<0.05$)。这些结果提示辣木籽提取物可能通过降低炎症因子 IL-18 和 IL-1 β 的分泌,起到抗炎作用。

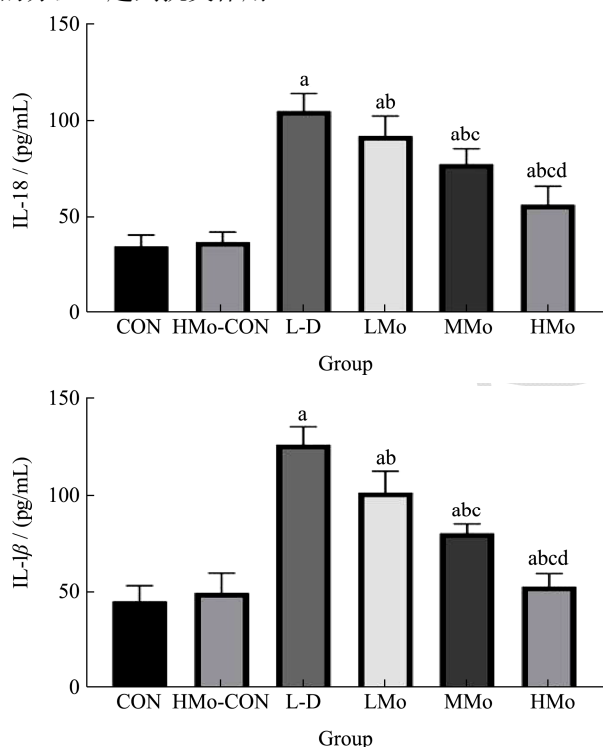


图 4 各组血清中 IL-18 和 IL-1 β 的含量

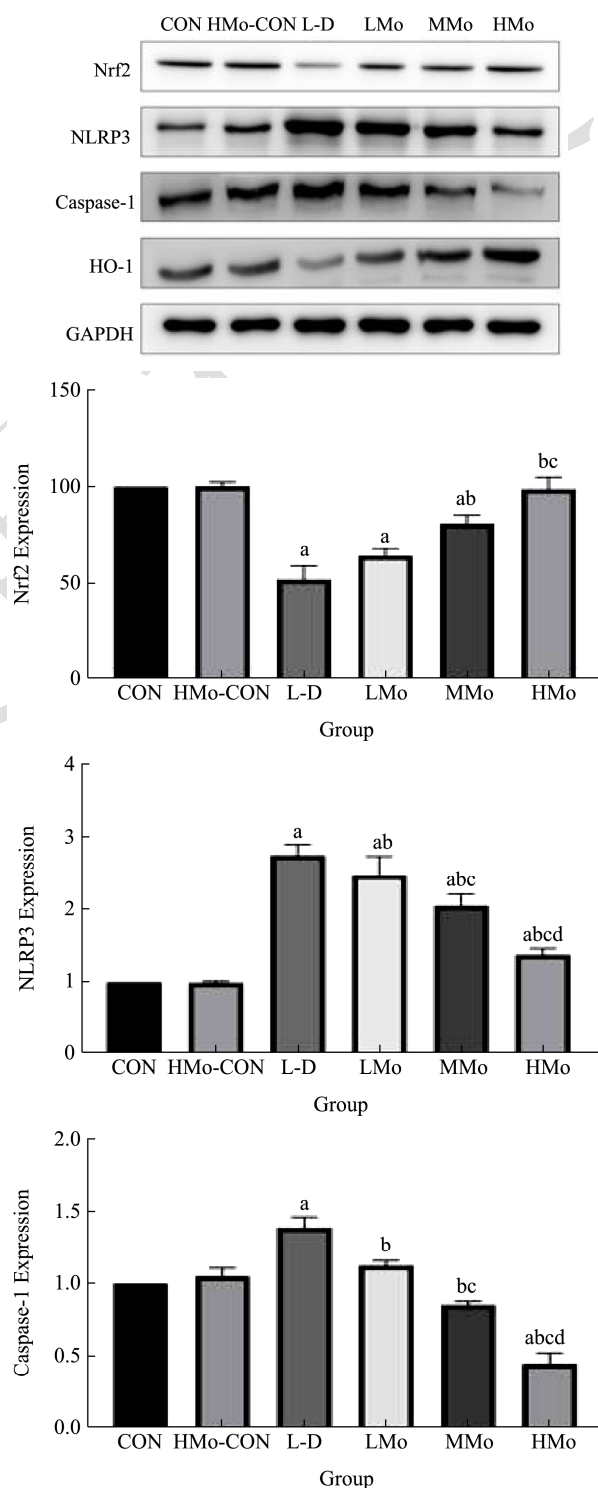
Fig.4 Contents of IL-18 and IL-1 β in serum of each group

注: a 表示与 CON group 比较差异显著, $P<0.05$; b 表示与 L-D group 比较差异显著, $P<0.05$; c 表示与 LMo group 比较差异显著, $P<0.05$; d 表示与 MMo group 比较差异显著, $P<0.05$ 。

3.6 辣木籽提取物对慢性酒精性肝损伤小鼠相关氧化应激及炎症相关蛋白表达的影响

上述研究结果表明,酒精可通过氧化应激和增加炎症因子的表达造成肝损伤,而辣木籽提取物可通过增加抗氧化物质含量以及降低炎症因子的表达从而减

缓酒精造成的肝损伤。有研究表明, Nrf2 作为抗氧化体系上游的重要调控转录因子,在氧化应激的状态下, Nrf2 可促进多种抗氧化基因的转录,如 GSH、HO-1 等。而在酒精的作用下, Nrf2 蛋白表达被抑制,抑制抗氧化防御系统,导致肝脏氧化应激加重^[27]。因此,为进一步探讨辣木籽提取物调控抗氧化因子的分子机制,测定了抗氧化体系上游的调控转录因子 Nrf2 及其下游转录因子 HO-1 的蛋白表达。



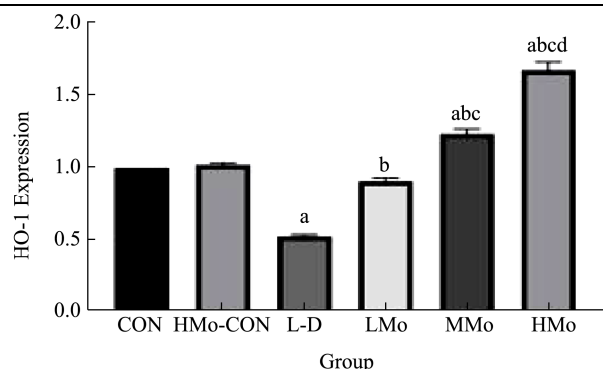


图5 各组肝组织中相关蛋白表达

Fig.5 Protein expression of Nrf2 and NLRP3 in liver tissues of each group

注: a 表示与 CON group 比较差异显著, $P<0.05$; b 表示与 L-D group 比较差异显著, $P<0.05$; c 表示与 LMo group 比较差异显著, $P<0.05$; d 表示与 MMo group 比较差异显著, $P<0.05$ 。

如图5所示,慢性酒精性肝损伤小鼠肝脏中 Nrf2 及 HO-1 的蛋白表达水平显著下降,表明慢性酒精暴露能显著抑制肝脏 Nrf2 的表达,进而抑制下游转录因子的表达,从而影响肝组织中 Nrf2 的抗氧化通路。不同剂量的辣木籽提取物能够剂量依赖的提高 Nrf2 蛋白水平,同时 HO-1 蛋白的表达水平也显著提高,提示在辣木籽提取物的作用下 Nrf2 信号通路被有效激活,进而增强氧化防御系统,产生抗氧化应激。在糖尿病肾病大鼠的研究中,辣木籽提取物可通过激活 Nrf2/HO-1 通路保护患病大鼠的肾功能,证实了辣木籽提取物可以激活 Nrf2/HO-1 信号通路对机体产生一定的保护作用^[28]。同时 Nrf2 也是 NLRP3 炎症小体的上游调控因子,其与 NLRP3 炎症小体的表达呈负相关,而 NLRP3 炎症小体可促进含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1 (Cysteiny Aspartate Specific Proteinase 1, Caspase-1) 的产生,同时 Caspase-1 涉及了 IL-18 及 IL-1 β 成熟与释放^[29,30],提示 NLRP3 的增加可加速炎症反应的进程。而辣木籽可减少心脏毒性临床前模型中 NLRP3 炎症小体的表达^[17],因此我们推测,辣木籽可能也存在抑制炎症因子的表达进而延缓酒精所致的慢性肝损伤进程,因此我们检测了小鼠肝组织中的 NLRP3 及 Caspase-1 的蛋白表达水平。Western blot 结果显示,慢性酒精性肝损伤小鼠肝脏中 NLRP3 的蛋白水平显著增高,提示慢性酒精暴露促进肝脏 NLRP3 的表达,同时 Caspase-1 在慢性酒精性肝损伤小鼠的肝脏组织中的表达水平也显著升高,证明在酒精的长期作用下,小鼠肝脏组织中的 NLRP3 炎症小体被激活并促进下游促炎因子 Caspase-1 的表达,加重其肝脏损伤。而不同剂量的辣木籽提取物能够剂量依赖性的降低 NLRP3 蛋白表达,同时降低 Caspase-1 的蛋白

表达,提示辣木籽提取物可以通过降低 NLRP3 的表达,降低下游促炎因子的表达,从而减轻慢性酒精暴露所致的小鼠肝脏的炎症反应。在关于 Nrf2 的研究中,有研究提示 Nrf2 是 NLRP3 炎症小体的上游调控因子,激活 Nrf2 的基因表达可有效抑制 NLRP3 炎症小体的表达^[29],在辣木籽提取物的作用下,Nrf2 的蛋白表达增高,其下游转录因子 HO-1 的表达增高,激活肝脏组织中的氧化防御系统,同时减少 NLRP3 炎症小体的表达,进而降低 Caspase-1 蛋白的表达,减轻肝脏组织中的炎症反应,从而改善酒精所致的慢性肝损伤,表明辣木籽提取物对肝脏具有保护作用。

3 结论

综上所述,辣木籽提取物能够降低慢性酒精性肝损伤小鼠血清中 ALT、AST 水平,呈现出对肝脏的保护作用。辣木籽提取物一方面通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路,提升肝脏抗氧化水平,降低脂质过氧化水平;另一方面通过抑制 NLRP3/Caspase-1 信号通路,减少 IL-18、IL-1 β 的成熟与释放,减轻炎症反应。因此辣木提取物可能通过促进小鼠肝脏的抗氧化及减少抗炎因子的表达来减轻酒精对小鼠肝脏的慢性损伤。

参考文献

- [1] 姚立群,柯昌荣,元建羽,等.1990-2019 年我国与世界不同社会人口学指数地区归因于饮酒导致的疾病负担比较分析[J].中国卫生经济,2022,41(5):64-67.
- [2] Osna N A, Donohue T M, Kharbanda K K. Alcoholic liver disease: Pathogenesis and current management [J]. Alcohol Research Health, 2017, 38(2): 147-161.
- [3] 彭颖.辣木籽水提物对酒精诱导线虫运动功能障碍的影响[J].食品与机械,2020,36(10):149-152,158.
- [4] 吴名草,郁星,沈旭丹,等.葛根枳椇子植物饮料对小鼠酒精性肝损伤的保护作用研究[J].粮油食品科技,2022,30(4): 157-163.
- [5] Ramamurthy S, Varghese S, Sudarsan S, et al. *Moringa oleifera*: Antioxidant, anticancer, anti-inflammatory, and related properties of extracts in cell lines: A review of medicinal effects, phytochemistry, and applications [J]. The Journal of Contemporary Dental Practice, 2021, 22(12): 1483-1492.
- [6] Govindarajan, Karthivashan, Palanisamy, et al. The molecular mechanism underlying the hepatoprotective potential of *Moringa oleifera* leaves extract against acetaminophen induced hepatotoxicity in mice [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 17: 115-126.

- [7] Tariq S, Umbreen H, Noreen R, et al. Comparative analysis of antioxidants activity of indigenously produced *Moringa oleifera* seeds extracts [J]. BioMed Research International, 2022, 15: 4987929.
- [8] 黄颖,谭书明,陈小敏,等.辣木籽多酚提取工艺优化及解酒功效研究[J].食品科技,2019,44(6):248-255.
- [9] 谭颀,夏国灯,韩杨,等.辣木籽多酚提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J].食品科技,2019,44(1):280-285.
- [10] 张蕾,王璐瑶,秦心宁,等.辣木籽对酒精和四氯化碳诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用[J].中国兽医杂志,2021,57(2): 90-94,129.
- [11] 刘金霞,王钰池,郭卓,等. microRNA-125b 通过调控 Nrf2/Keap1 信号通路影响光感受器细胞氧化应激[J].中国医科大学学报,2021,50(11):976-980,985.
- [12] 张茹,曲中原,杜娟.基于 Nrf2-HO-1/CYP2E1 通路探讨五指毛桃醇提取物对酒精性肝损伤小鼠的抗氧化保护机制[J].中药新药与临床药理,2021,32(12):1769-1775.
- [13] Lu Q, Shu Y, Wang L, et al. The protective effect of *Veronica ciliata* Fisch. Extracts on relieving oxidative stress-induced liver injury via activating AMPK/p62/Nrf2 pathway [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 270: 113775.
- [14] Mundkar M, Bijalwan A, Soni D, et al. Neuroprotective potential of *Moringa oleifera* mediated by NF-kB/Nrf2/HO-1 signaling pathway: A review [J]. Journal of Food Biochemistry, 2022, 46(12): e14451.
- [15] Wu J, Fernandes-Alnemri T, Alnemri E S. Involvement of the AIM2, NLRC4, and NLRP3 inflammasomes in caspase-1 activation by *Listeria monocytogenes* [J]. Journal of Clinical Immunology, 2010, 30(5): 693-702.
- [16] 初君怡.芥子酸调控 BRD4 对慢性酒精性肝损伤的保护作用研究[D].大连:大连医科大学,2021.
- [17] Quagliariello V, Basilicata M G, Pepe G, et al. Combination of *Spirulina platensis*, *Ganoderma lucidum* and *Moringa oleifera* improves cardiac functions and reduces pro-inflammatory biomarkers in preclinical models of short-term doxorubicin-mediated cardiotoxicity: New frontiers in cardioncology? [J]. Journal of Cardiovascular Development and Disease, 2022, 9(12): 423.
- [18] 汤兴楠,栾凯文,任帅,等.辣木籽有效成分提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J].中国食品添加剂,2022,33(6):53-61.
- [19] 梁华峰,张莉莉,吴帅,等.辣木种子提取物对小鼠实验性肝损伤的保护作用[J].中成药,2019,41(2):285-291.
- [20] 王熙瑶,刘宁,文凤,等.不同肝病基础乙肝相关原发性肝癌 AST/ALT 和 AFP 的表达水平差异及临床应用评价[J].胃肠病学和肝病杂志,2021,30(11):1234-1239.
- [21] 戴源,陈彬彬,姜欣,等.绵柔型白酒对小鼠酒精性肝损伤的影响作用研究[J].中国酿造,2022,41(6):141-147.
- [22] 陈洪锁,孟宪梅.酒精性肝病分子机制的研究进展[J].包头医学院学报,2018,34(8):127-129.
- [23] 陈丰,刘殿娜,陈绍红,等.枳椇解酒保肝方对酒精性肝损伤大鼠 SOD、MDA、GSH 的影响[J].北京中医药大学学报,2018,4:306-309.
- [24] 阎明.乙醇所致线粒体损伤与酒精性肝病机制的研究[D].济南:山东大学,2006.
- [25] 窦慧馨,张得钧.酒精性肝病分子发病机制研究进展[J].基因组学与应用生物学,2016,35(7):1643-1647.
- [26] 肖伟松,乐滢玉,曾胜澜,等.细胞焦亡在肝脏疾病中的作用[J].临床肝胆病杂志,2020,36(12):2847-2850.
- [27] 许皖,李娜,柳海艳,等.基于 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路探讨葛花、枳椇子及其配伍对急性酒精性肝损伤小鼠抗氧化应激的作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(1):37-44.
- [28] Wen Y, Liu Y, Huang Q, et al. *Moringa oleifera* Lam. seed extract protects kidney function in rats with diabetic nephropathy by increasing GSK-3 β activity and activating the Nrf2/HO-1 pathway [J]. Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology, 2022, 95: 153856.
- [29] 冯慧.基于 Nrf2/HO-1/NLRP3 炎性小体信号通路探讨芪参升降浊方改善 db/db 小鼠蛋白尿的机制[D].北京:中国中医科学院,2020.
- [30] 史琦.Sapidolide A 调控巨噬细胞中的 NLRP3 炎性小体治疗急性肝损伤的作用及机制研究[D].杭州:浙江大学,2021.