

红景天苷对对乙酰氨基酚诱导肝损伤模型小鼠 Keap1-Nrf2 信号通路的影响^Δ

左 玮*, 张 波, 梅 丹*(中国医学科学院北京协和医院药剂科/协和转化医学中心, 北京 100730)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)11-1487-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.11.12

摘要 目的:探讨红景天苷(SALD)对对乙酰氨基酚(APAP)诱导肝脏损伤模型小鼠的保护作用及机制。方法:将60只小鼠随机分为正常组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、阳性组(乙酰半胱氨酸,150 mg/kg)和SALD低、中、高剂量组(100,200,300 mg/kg),每组10只。除正常组外,其余各组小鼠均灌胃500 mg/kg的APAP复制肝损伤模型。造模前1 h,各组小鼠灌胃相应药物,连续5 d。给药结束后,测定小鼠血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、乳酸脱氢酶(LDH)含量,苏木精-伊红(HE)染色观察肝组织病理学改变,Western blot法检测肝组织中Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1)(细胞核内)、核转录因子NF-E2相关因子(Nrf2)(细胞核内)、血红素氧合酶1(HO-1)(细胞质中)、还原型辅酶/醌氧化还原酶(NQO1)(细胞质中)以及谷氨酰半胱氨酸连接酶(GCLC)(细胞质中)蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组小鼠血清中ALT、AST、ALP和LDH含量显著增加($P<0.01$),肝组织发生肝小叶结构紊乱辨别不清、肝细胞嗜酸性坏死等病变,肝组织中Nrf2、Keap1、HO-1、GCLC蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,除SALD低剂量组小鼠血清中LDH含量减少和阳性组小鼠肝组织中Nrf2、Keap1表达水平升高不显著外,其余各组小鼠上述指标均显著改善($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且各给药组小鼠肝组织中NQO1蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);各给药组小鼠肝组织病理变化均得到不同程度好转。结论:SALD对APAP诱导的肝损伤具有保护作用;其机制可能与促进Keap1、Nrf2入核,增强肝组织中NO-1、NQO1和GCLC蛋白表达有关。

关键词 红景天苷;对乙酰氨基酚;肝损伤;小鼠;Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1;核转录因子NF-E2相关因子

Effects of Salidroside on Keap1-Nrf2 Signal Pathway in Acetaminophen-induced Liver Injury Model Mice
ZUO Wei, ZHANG Bo, MEI Dan (Dept. of Pharmacy/Union Translational Medicine Center, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the protection role and mechanisms of salidroside (SALD) on acetaminophen (APAP)-induced liver injury model mice. METHODS: 60 mice were randomly divided into normal group (normal saline), model group (normal saline), positive group (acetylcysteine, 150 mg/kg), SALD low-dose, medium-dose and high-dose groups (100, 200, 300 mg/kg), with 10 mice in each group. Except for normal group, other groups were given APAP 500 mg/kg intragastrically to induce liver injury model. 1 h before modeling, mice were given relevant medicine intragastrically for consecutive 5 d. After medication, the serum contents of ALT, AST, ALP and LDH were determined, and the pathohistological changes of the liver tissue were observed by HE staining. The protein expressions of Keap1 (in tranuclear), Nrf2 (in tranuclear), HO-1 (in tracytoplasm), NQO1 (in tracytoplasm) and GCLC (in tracytoplasm) in liver tissue were determined by Western blot assay. RESULTS: Compared with normal group, serum contents of ALT, AST, ALP and LDH in model group were increased

[12] IBARGUREN M, LOPEZ DJ, ESCRIBA PV. The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1838(6): 1518-1528.

[13] ESQUIVEL-FERRINO PC, FABELA-HERNANDEZ JMJ, GARAZA-GONZALEZ E. et al. Antimycobacterial activi-

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81601033);北京市自然科学基金资助项目(No.7174342);中国医学科学院医学与健康科技创新工程(No.2017-I2M-1-011)

* 药师, 博士。研究方向:医院药学、神经药理、药物毒理。E-mail: eileenzuo@163.com

通信作者:主任药师。研究方向:医院药学、临床药学。E-mail: meidanpumch@163.com

ty of constituents from *Foeniculum vulgare* var. dulce grown in Mexico[J]. *Molecules*, 2012, 17(7):8471-8482.

[14] KELSEY JA, BAYLES KW, SAHFII B, et al. Fatty acids and monoacylglycerols inhibit growth of *Staphylococcus aureus*[J]. *Lipids*, 2006, 41(10):951-961.

[15] 彭可, 梅文莉, 吴娇, 等. 白木香内生真菌 *Aspergillus* sp. A14 的挥发性成分及其抗菌活性[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(1):85-88.

[16] GORAN B, BJOM W, CATHARINA S. *Escherichia coli*, fimbriae, bacterial persistence and host response induction in the human urinary tract[J]. *Int J Med Microbiol*, 2005, 295(6):487-502.

(收稿日期:2017-12-21 修回日期:2018-03-18)

(编辑:林 静)

significantly ($P < 0.01$). The liver lobuli hepatitis disorder and difficult to recognize, liver cell eosinophilic necrosis and other lesions were found in liver tissue. The protein expressions of Nrf2, Keap1, HO-1 and GCLC in liver tissue were decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with model group, above indexes of all groups were improved significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), except that the decrease of LDH content in serum of mice in SALD low-dose group and the expression improvement of Nrf2 and Keap1 in liver tissue were not significant in positive group. The expression of NQO1 protein in liver tissue of mice was increased significantly in administration groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); pathohistological exchange of liver tissue in mice was improved in administration groups to different extent. CONCLUSIONS: SALD can protect APAP-induced liver injury; the mechanism of which may be associated with promoting Keap1, Nrf2 into the of nucleu and strengthening the protein expression HO-1, NQO1, GCLC in liver tissue.

KEYWORDS Salidroside; Acetaminophen; Liver injury; Mice; Keap1; Nrf2

对乙酰氨基酚(Acetaminophen, APAP)又名扑热息痛,是一种常用的解热镇痛药,于1893年首次合成,1960年作为非处方药(OTC),是公认推荐剂量安全有效、胃肠道不良反应较少的解热镇痛药^[1],但其会导致肝损伤,这成为限制其临床应用的主要问题之一,至今尚未得到解决。红景天(*Rhodiola rosea* L.)为景天科多年生草本或灌木植物,药用历史悠久。红景天苷(Salidroside, SALD)是红景天经现代化学分离提取后的主要活性成分,具有抗疲劳、抗衰老、抗炎、镇痛、调节免疫等多种药理作用^[2-3]。戴博等^[4]发现高山红景天对APAP诱导的小鼠肝损伤具有保护作用,但其作用机制并不清楚。氧化应激与肝疾病的发生息息相关,APAP代谢过程中产生的自由基、亲电体和活性氧自由基(ROS)可以引起脂质过氧化,最终导致肝损伤。无论是酒精性或者非酒精性脂肪肝疾病,还是药物或者其他化合物导致的肝损伤中,Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1)核转录因子NF-E2相关因子(Nrf2)信号通路在调节氧化应激的过程中都起到了重要作用^[5]。本研究用APAP诱导小鼠肝损伤模型,观察SALD抗药物性肝损伤的作用,并从Keap1-Nrf2信号通路出发对其作用机制进行探讨,为阐明SALD对APAP所致肝损伤的保护作用机制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

BX51型显微镜(德国Leica公司);2K16型台式低温离心机(德国Sigma公司);DYY-7C型电泳转移装置(北京六一仪器厂);TBA-40FR型全自动生化分析仪(日本Toshiba公司)。

1.2 药品与试剂

乙酰半胱氨酸(NAC)标准品(批号:1009005,纯度:98%)、SALD标准品(批号:05410590,纯度:99%)均购自美国Sigma公司;APAP标准品(上海麦克林生化科技有限公司,批号:103-90-2,纯度:99%);丙氨酸转氨酶(ALT,批号:2014-2401158)、天冬氨酸转氨酶(AST,批号:2014-2401157)、碱性磷酸酶(ALP,批号:2014-2401128)、乳酸脱氢酶(LDH,批号:2014-2401131)、胞浆核蛋白提取试剂盒以及辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔/羊抗小鼠二抗均购自中生北控生物科技有限公司;Nrf2、Keap1、血红素氧合酶1(HO-1)、还原型辅

酶/醌氧化还原酶1(NQO1)和谷氨酸半胱氨酸连接酶(GCLC)、 β -肌动蛋白(β -actin)、抗增殖性细胞核抗原(PCAN)抗体均购自美国Santa Cruz公司。

1.3 动物

C57BL/6小鼠60只,SPF级,♂,体质量23~25 g,由北京斯贝福实验动物科学技术有限公司提供,实验动物质量合格证号:SCXK(京)2011-0004。整个实验过程遵循中国医学科学院北京协和医院动物福利伦理委员会要求。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将60只小鼠随机分为6组,每组10只,分别为正常组、模型组、阳性组(150 mg/kg NAC)^[6]和SALD低、中、高剂量组(100、200、300 mg/kg)^[7-9]。各组小鼠均给予正常饲料,自由饮水。各给药组小鼠按10 mL/kg灌胃相应药物,给药后1 h灌胃500 mg/kg的APAP;正常组和模型组小鼠灌胃等体积生理盐水,其中模型组小鼠在给予生理盐水后1 h灌胃500 mg/kg的APAP。每天给药1次,连续给药5 d。

2.2 血清生化指标检测

末次给药后禁食不禁水,9 h后对小鼠摘除眼球取血,将血样于室温下静置120 min,然后以1 409×g离心10 min,常规分离血清,采用全自动生化分析仪测定小鼠血清中ALT、AST、ALP和LDH含量。

2.3 肝组织病理学观察

取血后处死小鼠,取肝大叶同一部分组织,以3%蔗糖-多聚甲醛溶液(4%多聚甲醛配制)固定,常规制备石蜡切片(4 μ m),脱蜡,水化。行苏木精-伊红(HE)染色,用自来水和蒸馏水依次洗涤浮色,75%盐酸乙醇分化并用蒸馏水洗涤,封片,在显微镜下拍照观察各组小鼠肝组织病理学变化。

2.4 肝组中Keap1-Nrf2信号通路相关蛋白检测

采用Western blot法检测小鼠肝组织中Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1和GCLC蛋白表达。取各组小鼠(每组选4只)肝大叶同一部分组织,称质量,放入预冷的组织裂解液中裂解30 min,然后将裂解组织收集到1.5 mL EP管中进行超声匀浆,将组织匀浆于4 $^{\circ}$ C条件下以13 400×g离心20 min,取上清(为全蛋白)。按照胞浆胞

核蛋白提取试剂盒说明分别提取细胞质和细胞核蛋白,二喹啉甲酸法(BCA)进行蛋白定量。每组取 50 g 蛋白样品上样,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳对样品进行分离。分离后进行转膜、封闭,加入相应一抗(1:1 000)后 4 ℃ 孵育过夜,弃去一抗;TBST 洗膜洗 3 次,加入二抗(1:5 000),室温摇床孵育 2 h。加入增强化学发光液,采用成像软件 LAS3000 Image Reader 拍照并保存图像,Quantity one 软件进行图片分析,计算条带灰度值,以目的蛋白条带灰度值与内参(细胞核蛋白测定以 PCAN 为内参,细胞质蛋白测定以 β -actin 为内参)条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达量。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 10.0 软件学进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Turkey's test 法。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 血清生化指标测定结果

与正常组比较,模型组小鼠血清中 ALT、AST、ALP 和 LDH 含量显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组小鼠血清中 ALT、AST、ALP 和 LDH 含量均不同程度减少,除 SALD 低剂量组小鼠血清中 LDH 含量减少不显著外,其余各给药组小鼠血清中各指标含量均显著减少($P < 0.01$),结果见表 1。

表 1 各组小鼠血清中 ALT、AST、ALP 和 LDH 含量测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10, U/L$)

Tab 1 Content determination of ALT, AST, ALP and LDH in serum of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 10, U/L$)

组别	ALT	AST	ALP	LDH
正常组	51.33 ± 66.46	26.52 ± 111.31	41.96 ± 29.01	165.53 ± 109.33
模型组	649.34 ± 66.46**	800.65 ± 100.42**	195.87 ± 20.33**	1 453.33 ± 83.64**
阳性组	139.87 ± 55.26**	136.51 ± 98.91**	84.92 ± 19.05**	451.36 ± 85.64**
SALD 低剂量组	328.54 ± 46.58**	486.11 ± 82.31**	86.79 ± 23.01**	1 241.86 ± 89.32
SALD 中剂量组	119.36 ± 39.26**	135.89 ± 86.46**	81.46 ± 24.46**	501.27 ± 94.47**
SALD 高剂量组	181.67 ± 27.91**	191.43 ± 79.26**	124.52 ± 30.61**	857.13 ± 96.64**

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.01$

Note: vs. normal group, ** $P < 0.01$; vs. model group, ** $P < 0.01$

3.2 肝组织病理学观察结果

正常组小鼠肝小叶结构清晰,肝索排列整齐,以中央静脉为中心呈放射状,肝细胞正常。模型组小鼠肝小叶结构紊乱辨别不清,肝细胞嗜酸性坏死,在汇管区周围肝细胞促生小脂肪滴(图中箭头所示)。各给药组小鼠肝组织病理改变均不同程度好转,其中 SALD 中剂量组小鼠肝小叶结构清晰,肝细胞坏死少见,偶见油滴出现。各组小鼠肝组织病理学观察结果见图 1。

3.3 肝组织中 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 和 GCLC 蛋白表达测定结果

与正常组比较,模型组小鼠肝组织中 Nrf2(细胞核内)、Keap1(细胞核内)、HO-1(细胞质中)、GCLC(细胞质中)蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$)。与模型组

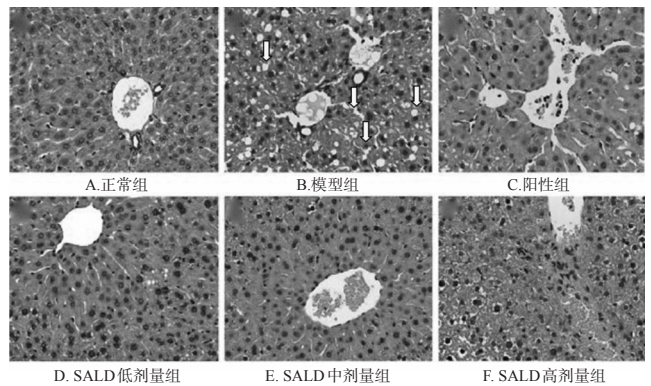


图 1 各组小鼠肝组织病理学观察结果(HE 染色, × 100)

Fig 1 Pathohistological observation of liver tissue of mice in each group(HE staining, × 100)

比较,除阳性组小鼠肝组织中 Nrf2(细胞核内)、Keap1(细胞核内)蛋白表达水平升高不显著外,其余各组小鼠的其余各蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组小鼠肝组织中 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 和 GCLC 蛋白表达测定的电泳图见图 2,测定结果见表 2。

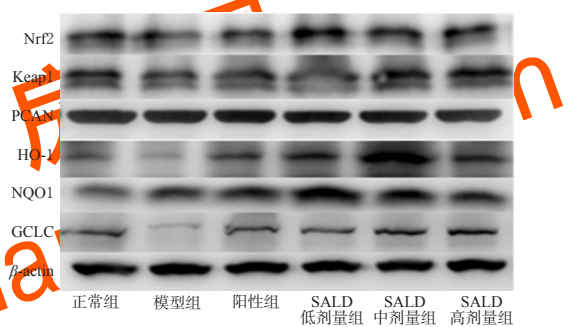


图 2 各组小鼠肝组织中 Keap1-Nrf2 信号通路相关蛋白表达测定的电泳图

Fig 2 Electrophorograms of determination of Keap1-Nrf2 signal pathway related protein in liver tissue of mice in each group

表 2 各组小鼠肝组织中 Keap1-Nrf2 信号通路相关蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Tab 2 Determination results of Keap1-Nrf2 signal pathway related protein expression level in liver tissue of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	Nrf2/PCAN	Keap1/PCAN	HO-1/ β -actin	NQO1/ β -actin	GCLC/ β -actin
正常组	0.509 ± 0.101	0.530 ± 0.019	0.412 ± 0.059	0.776 ± 0.091	0.460 ± 0.047
模型组	0.363 ± 0.037*	0.314 ± 0.037*	0.155 ± 0.038*	0.772 ± 0.079	0.234 ± 0.038*
阳性组	0.362 ± 0.045	0.379 ± 0.029	0.541 ± 0.041*	1.269 ± 0.093*	0.497 ± 0.069*
SALD 低剂量组	0.609 ± 0.039**	0.740 ± 0.021**	0.770 ± 0.029*	1.645 ± 0.121**	0.500 ± 0.065*
SALD 中剂量组	0.513 ± 0.032**	0.707 ± 0.034**	1.150 ± 0.021**	1.162 ± 0.084*	0.601 ± 0.050**
SALD 高剂量组	0.562 ± 0.033**	0.530 ± 0.030*	0.869 ± 0.027*	1.112 ± 0.087*	0.500 ± 0.063*

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,** $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$; vs. model group, ** $P < 0.05$,** $P < 0.01$

0.01

4 讨论

APAP 是临床应用广泛的乙酰苯胺类解热镇痛药

物,是引发药物性肝损伤的常见药物^[10]。20世纪初期APAP开始得到普遍应用,过量或者同时服用2~3种含有该成分的药品易发生一系列不良反应,其中最不容忽视的就是其对肝的损伤,严重时会引起肝衰竭甚至危及生命^[11-12]。因此,APAP诱发的肝毒性已成为研究药物所致肝疾病的必要内容。

APAP的中毒主要表现为肝小叶中央型肝实质坏死和细胞网架的塌陷。临床上,肝坏死表现在中毒后几小时比较明显,伴有AST、ALT、ALP和LDH的大幅度升高^[13],这些指标反应了肝组织坏死的程度。APAP中毒后可以采取催吐洗胃和导泻等措施。此外,还可以服用活性炭,吸附肠道内APAP,减少其吸收。而临床最常用的解毒剂是NAC,其可通过维持肝组织中谷胱甘肽浓度,阻止大分子硫醇基团被氧化进而发挥保护作用,故本研究以其为阳性对照药。

SALD是红景天中最主要的有效成分之一,通常将其含量作为评价红景天药用价值的重要指标^[13]。SALD具有抗缺氧、清除自由基和抗氧化等作用^[14]。本研究发现,SALD可以逆转APAP引起的小鼠血清中ALT、AST、ALP和LDH含量的增加。组织病理结果提示,SALD还可以改善肝细胞坏死的情况,但SALD高剂量组效果不如中剂量组。有研究报道^[15-16],SALD对免疫系统具有激活作用。因此笔者推测,高剂量的SALD可能诱发了炎症反应,进而抵消了其保护作用,但其具体原因还需进一步的研究进行验证。

Nrf2是Keap1-Nrf2信号通路中的一个重要因子,其通过与细胞核内的抗氧化反应原件(ARE)结合,上调抗氧化酶的表达以抵抗自由基的氧化作用^[17]。生理条件下,Nrf2被Keap1偶联,隔离于细胞的细胞质中;外来刺激下,Nrf2被激活,从Nrf2-Keap1二聚体释放转移进入细胞核,继而通过与ARE结合启动下游基因的表达,发挥其抗氧化作用^[18]。本研究结果显示,APAP损伤小鼠肝组织中Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1和GCLC蛋白表达水平均不同程度降低,而SALD可显著升高上述蛋白的表达。而Nrf2入核后,可与ARE结合启动下游HO-1、NQO1、GCLC基因的表达,发挥抗氧化作用。

综上所述,SALD对APAP诱导肝损伤具有一定的保护作用,其机制可能与促进Nrf2和Keap1入核,增强肝组织中HO-1、NQO1和GCLC蛋白的表达有关,但其确切作用机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] 赖荣陶,谢青.对乙酰氨基酚所致肝损伤的临床诊治新进展[J].肝脏,2011,16(2):159-161.
[2] PETER G, SHAHEER R, NARAYANAN P, et al. Hepatic artery aneurysm: a rare case of obstructive jaundice with severe hemobilia[J]. *Ann Gastroenterol*, 2014, 27(3):288-289.
[3] XIN KY, YEE LS, YONG TT, et al. Obstructive jaundice due to intraductal tumour thrombus in recurrent hepato-

cellular carcinoma: what is the optimal therapeutic approach? [J]. *Hepatogastroenterology*, 2014, 61(135):1863-1866.

[4] 戴博,宋妍,王占一,等.高山红景天对对乙酰氨基酚所致小鼠急性肝损伤的保护作用[J].时珍国医国药,2007,18(6):1305-1306.
[5] XUEPING C, CHUNYUAN G, KONG J. Oxidative stress in neurodegenerative disease[J]. *Neural Regeneration Research*, 2012, 7(5):376-385.
[6] GAO Y, CHU SF, XIA CY, et al. Rg1 attenuates alcoholic hepatic damage through regulating AMPK and Nrf2 signal pathways[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2016, 18(8):765-778.
[7] 张立超,王晨宇,曹慧芳,等.红景天苷对梗阻性黄疸大鼠的肝保护作用及机制探讨[J].山东医药,2015,55(46):32-33.
[8] 王晓东,刘永刚,苏薇薇.红景天苷对小鼠实验性肝损伤的保护作用[J].中药材,2004,27(3):198-199.
[9] 张奕,刘永刚.红景天苷抗肝纤维化的实验研究[J].中国药房,2007,18(11):813-815.
[10] LIN Z, WU F, LIN S, et al. Adiponectin protects against acetaminophen-induced mitochondrial dysfunction and acute liver injury by promoting autophagy in mice[J]. *J Hepatol*, 2014, 61(4):825-831.
[11] BERNAL W, WENDON J. Acute liver failure[J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(26):2525-2534.
[12] GUM SI, CHO MK. Korean red ginseng extract prevents APAP-induced hepatotoxicity through metabolic enzyme regulation: the role of ginsenoside Rg₃, a protopanaxadiol [J]. *Liver Int*, 2013, 33(7):1071-1084.
[13] 董礼.柴胡红景天化学成分的研究[J].西北植物学报,2007,27(12):2564-2567.
[14] 关鑫.红景天的临床功效与药理作用研究[J].中国医药导报,2010,7(32):14-16.
[15] GUAN S, HE J, GUO W, et al. Adjuvant effects of salidroside from *Rhodiola rosea* L. on the immune responses to ovalbumin in mice[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2011, 33(4):738-743.
[16] LI HX, SZE SC, TONG Y, et al. Production of Th1-and Th2-dependent cytokines induced by the Chinese medicine herb, *Rhodiola algida*, on human peripheral blood monocytes[J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 123(2):257-266.
[17] XUE H, XIE W, JIANG Z, et al. 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, a microbiota-derived metabolite of quercetin, attenuates acetaminophen (APAP)-induced liver injury through activation of Nrf-2[J]. *Xenobiotica*, 2016, 46(10):931-939.
[18] TRUSHINA E, MCMURRAY CT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases [J]. *Neuroscience*, 2007, 145(4):1233-1248.

(收稿日期:2017-11-01 修回日期:2018-01-10)

(编辑:林静)