

大飞扬草外泌体纳米囊泡调控 Nrf2/HO-1/NQO1 通路改善对乙酰氨基酚诱导肝损伤的机制研究[△]

王炎玉^{1*}, 陈磊^{2,3}, 刘仁杰¹, 乡世健^{2,3}, 周本杰^{1,2,3#}[1. 中山大学药学院(深圳), 广东深圳 518107; 2. 中山大学附属第七医院药学部, 广东深圳 518107; 3. 深圳市中药活性物质筛选与转化重点实验室, 广东深圳 518107]

中图分类号 R965;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)09-1134-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.09.05



摘要 目的 基于核因子E₂相关因子(Nrf2)/血红素加氧酶1(HO-1)/醌氧化还原酶1(NQO1)通路,探讨大飞扬草外泌体纳米囊泡(Eh-ENVs)对对乙酰氨基酚(APAP)诱导肝损伤的改善作用及机制。**方法** 通过考察Eh-ENVs对RAW264.7和AML12细胞活力的影响,以及对正常小鼠血清肝、肾功能指标和肝、肺等组织病理形态学的影响,评价其安全性。构建脂多糖(1 μg/mL)诱导的RAW264.7细胞炎症模型,考察10、20 μg/mL Eh-ENVs对模型细胞中炎症因子mRNA表达和活性氧(ROS)水平的影响,并考察RAW264.7细胞对Eh-ENVs的摄取效率。构建APAP诱导的肝损伤小鼠模型,考察4 mg/kg Eh-ENVs对模型小鼠血清肝功能指标,肝组织病理形态学,肝组织中炎症因子mRNA表达、丙二醛(MDA)水平、超氧化物歧化酶(SOD)水平以及Nrf2/HO-1/NQO1通路相关mRNA及其蛋白表达的影响。**结果** 体外实验结果显示,Eh-ENVs对RAW264.7和AML12细胞均无增殖抑制作用;Eh-ENVs可被RAW264.7细胞高效摄取,并能显著降低细胞中白细胞介素1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)mRNA表达和ROS水平($P < 0.05$)。体内实验结果显示,4 mg/kg Eh-ENVs对正常小鼠无明显毒副作用;可显著降低模型小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平($P < 0.05$),上调/升高肝组织中IL-10 mRNA以及Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA及其蛋白表达和SOD水平($P < 0.05$),下调/降低肝组织中TNF-α、IL-1β mRNA表达和MDA水平($P < 0.05$)。**结论** Eh-ENVs可能通过激活Nrf2/HO-1/NQO1通路,抑制炎症反应并减轻氧化应激,进而改善APAP诱导的肝损伤。

关键词 大飞扬草;外泌体纳米囊泡;药物性肝损伤;氧化应激;Nrf2/HO-1/NQO1通路;对乙酰氨基酚

Study on the mechanism of *Euphorbia hirta* L.-derived exosome-like nanovesicles regulating Nrf2/HO-1/NQO1 pathway to improve acetaminophen-induced liver injury

WANG Yanyu¹, CHEN Lei^{2,3}, LIU Renjie¹, XIANG Shijian^{2,3}, ZHOU Benjie^{1,2,3}[1. School of Pharmaceutical Sciences (Shenzhen), Sun Yat-sen University, Guangdong Shenzhen 518107, China; 2. Dept. of Pharmacy, the Seventh Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangdong Shenzhen 518107, China; 3. Shenzhen Key Laboratory for Screening and Transformation of Active Substances from Traditional Chinese Medicine, Guangdong Shenzhen 518107, China]

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the ameliorative effect and mechanism of *Euphorbia hirta* L.-derived exosome-like nanovesicles (Eh-ENVs) on acetaminophen (APAP)-induced liver injury based on the nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1)/NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) pathway. **METHODS** The safety of Eh-ENVs was evaluated by examining their effects on the viability of RAW264.7 and AML12 cells, as well as serum liver and kidney function indicators and histopathology of liver, lung, and other tissues in normal mice. A lipopolysaccharide (1 μg/mL)-induced RAW264.7 cell inflammation model was constructed to investigate the effects of 10 and 20 μg/mL Eh-ENVs on the mRNA expression of inflammatory factors and reactive oxygen species (ROS) level in model cells, and the uptake efficiency of Eh-ENVs by RAW264.7 cells was also examined. An APAP-induced liver injury mouse model was established to investigate the effects of 4 mg/kg Eh-ENVs on serum liver function indicators, liver histopathology, mRNA expression of inflammatory factors, malondialdehyde (MDA) level, superoxide dismutase (SOD) level, and mRNA and protein expressions related to the Nrf2/HO-1/NQO1 pathway in liver tissue of model mice. **RESULTS** *In vitro* results showed that Eh-ENVs had no inhibitory effect on the proliferation of RAW264.7 and AML12 cells; Eh-ENVs could be efficiently taken up by RAW264.7 cells and significantly reduced the mRNA expression of interleukin-1β (IL-1β), tumor necrosis factor-α (TNF-α), and ROS level in cells ($P < 0.05$). *In vivo* results showed that 4 mg/kg Eh-ENVs had no obvious toxic side effects on normal mice, could significantly

[△] 基金项目 国家自然科学基金项目(No.82470650);深圳市科技计划项目(No.ZDSYS20220606100801003)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:递送系统、代谢性疾病。
E-mail:wangyy398@mail2.sysu.edu.cn

通信作者 主任药师,博士生导师,博士。研究方向:中药活性成分筛选与药理作用。E-mail:zhoubj23@mail.sysu.edu.cn

decrease the serum alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) levels in model mice ($P < 0.05$), upregulated/increased the mRNA expressions of IL-10, as well as the mRNA and protein expressions of Nrf2, HO-1, and NQO1, and SOD level in liver tissue ($P < 0.05$), and down-regulated/decreased the mRNA expression of TNF- α , IL-1 β and MDA level in liver tissue ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS** Eh-ENVs may activate the Nrf2/HO-1/NQO1 pathway to inhibit inflammatory response and alleviate oxidative stress, thereby improving APAP-induced liver injury.

KEYWORDS *Euphorbia hirta* L.; exosome-like nanovesicles; drug-induced liver injury; oxidative stress; Nrf2/HO-1/NQO1 pathway; acetaminophen

药物性肝损伤(drug-induced liver injury, DILI)是指由化学药品、生物制品等按处方药或非处方药管理的药品,以及中药材、天然药物、膳食补充剂等产品,或其代谢产物乃至其辅料、杂质等所导致的肝损伤,主要表现为肝脏代谢紊乱和功能障碍,严重者可致命,已成为重大公共卫生问题^[1-2]。对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)是临床上常见的解热镇痛药,其过量使用是引起肝损伤的主要原因之一^[3]。目前,*N*-乙酰半胱氨酸(*N*-acetylcysteine, NAC)是美国FDA唯一批准用于治疗APAP所致肝损伤的药物,但其仅对肝损伤早期的疗效较好,且存在明显的胃肠道毒副作用^[4-5]。因此,开发针对APAP诱导肝损伤的安全、有效的治疗药物具有重要临床意义。

氧化应激失衡与炎症反应过度激活是APAP诱导肝损伤发生发展的核心环节,大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)堆积可直接造成肝细胞脂质过氧化,进而导致肝衰竭^[6]。核因子E₂相关因子(nuclear factor erythroid 2 related factor 2, Nrf2)是调控氧化反应的关键转录因子,其被激活后可上调下游血红素加氧酶1(heme oxygenase-1, HO-1)和醌氧化还原酶1[NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, NQO1]等抗氧化酶的表达,增强机体抗氧化能力,从而减轻肝损伤^[7]。已有研究表明,激活Nrf2/HO-1/NQO1通路可有效缓解小鼠DILI^[8],这为DILI的治疗提供了重要靶点。

大飞扬草是大戟科大戟属植物飞扬草*Euphorbia hirta* L.的全草,传统用于利湿止痒、清热解毒、通乳。现代药理研究显示,其具有抗炎、抗氧化等药理活性^[9],在肝脏疾病防治中展现出潜在的应用价值。植物源性外泌体纳米囊泡因低免疫原性、高生物相容性等特点,已成为药物递送和活性物质研究的热点^[10]。大飞扬草外泌体纳米囊泡(*Euphorbia hirta* L.-derived exosome-like nanovesicles, Eh-ENVs)是从大飞扬草中分离的具有完整膜结构的纳米级囊泡,具有抗炎、抗氧化及保肝作用^[11]。然而,其对APAP诱导肝损伤的保护作用及其具体的分子机制仍不够清楚。基于此,本研究拟制备Eh-ENVs,并通过体内外实验评估其对APAP诱导肝损伤的保护作用,并从Nrf2/HO-1/NQO1通路出发,探讨其作用机制,为开发新型DILI治疗药物提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有:Mini-PROTEAN型垂直电泳装置(美国Bio-Rad公司),XPN-100型超高速离心机、CytoFlex型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司),Tanon 5200型全自动化学发光图像分析系统(上海天能生命科学生物有限公司),Archimed X4型医用荧光定量PCR仪[鲲鹏(徐州)科学仪器有限公司],EPOCH-SN型微孔板分光光度计[博兴(深圳)生物科技有限公司],KF-PRO-020型数字病理切片扫描仪[江丰(宁波)生物信息技术有限公司],HT-7800型透射电镜(日本Hitachi公司),Nano ZEN型动态光散射仪(英国Malvern Panalytical公司)等。

1.2 主要药品与试剂

大飞扬草新鲜全草购自互联网山村中草批发店铺,产地为广东揭阳,采摘时间为2025年10月,样品经中山大学附属第七医院药理学部副主任药师乡世健鉴定为真品;丙氨酸氨基转移酶(alanine transaminase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate transaminase, AST)、肌酐(creatinine, Cr)和尿素(Urea)检测试剂盒(批号分别为100020000、100020010、100020170、100000280)均购自中生北控生物科技股份有限公司; β -肌动蛋白(β -actin)兔单克隆抗体(批号284370)、HO-1兔单克隆抗体(批号383875)和NQO1兔单克隆抗体(批号364276)均购自艾比玛特生物医药(上海)有限公司;Nrf2兔单克隆抗体(批号6100010967)购自爱博泰克生物科技(武汉)有限公司;BCA蛋白检测试剂盒(批号A423250903)、DCFH-DA探针(批号A376250606)均购自上海碧云天生物技术股份有限公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(批号分别为20251002、20250729)均购自南京建成生物工程研究所有限公司;白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)等引物序列均由上海睿博信息科技有限公司设计并合成。

1.3 动物

本研究所用动物为7~8周龄SPF级C57/6雄性小鼠,共22只,体重(22 \pm 1)g,购自珠海百试通生物科技有限公司[动物生产许可证号:SCXK(粤)2025-0051]。小鼠饲养于深圳华腾生物医药科技有限公司[动物使用许可

证号:SYXK(粤)2023-0327],饲养环境温度为(22±1)℃、自然昼夜节律。饲养期间小鼠自由饮水与进食。本研究动物实验已获深圳华腾生物医药科技有限公司实验动物使用与管理委员会批准,批号为B202510-5。

1.4 细胞

本研究所用的巨噬细胞RAW264.7和AML12均购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

2 方法

2.1 Eh-ENVs的分离、纯化与表征

参考既往研究^[11-12],并进行条件优化后制备Eh-ENVs。将新鲜大飞扬草全草500g榨汁过滤后得粗滤液,取粗滤液于离心管中,在4℃下以4000r/min离心30min,弃大颗粒杂质;取上清液转入新离心管,再在4℃下以12000r/min离心30min,弃小颗粒杂质;上清液依次经0.8、0.45、0.22μm滤膜过滤后转入超速离心管,在4℃下以150000×g离心90min,弃上清液,得到纯化后的Eh-ENVs,并用BCA试剂盒测定样本中总蛋白浓度。将提纯后的Eh-ENVs进行分装,各取10μL分别用于粒径、Zeta电位与形貌表征;其中,形貌通过透射电镜检测,粒径与Zeta电位通过动态光散射检测。剩余样品储存于-80℃冰箱中,备用。

2.2 细胞培养

RAW264.7细胞用含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素溶液(50U/mL青霉素+50U/mL链霉素,下同)的DMEM培养基培养;AML12细胞用含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素溶液、0.5%转铁蛋白和0.01%地塞米松(40ng/mL)的DMEM/F-12培养基培养。培养参数设定为37℃恒温、5%CO₂及饱和湿度。当细胞生长密度达70%~80%时用于后续实验。

2.3 细胞实验

2.3.1 Eh-ENVs对细胞的毒性评价

采用CCK-8法检测。将RAW264.7和AML12细胞分别接种于96孔板中,设置调零孔(只含培养基不含细胞)、空白对照孔(只含细胞不给药)和实验组。实验组(每组设置4个复孔)分别用5、10、25、50、100μg/mL的Eh-ENVs处理细胞24h后,弃掉培养基;用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞,加入10μL CCK-8试剂和90μL无血清基础培养基,孵育0.5~1h,然后用微孔板分光光度计测定450nm波长处的吸光度,并计算细胞活力。细胞活力(%)=(实验组吸光度-调零孔吸光度)/(空白对照孔吸光度-调零孔吸光度)×100%。

2.3.2 细胞分组与给药

将处于对数生长期的RAW264.7细胞分为正常组、模型组和Eh-ENVs低、高浓度组,每组设置3个复孔。除正常组外,其余各组均加入1μg/mL脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激细胞1h以构建炎症细胞模型(模拟APAP诱导的肝损伤过程)。而后,将模型组的培养基换

成新鲜完全培养基,将Eh-ENVs低、高浓度组的培养基换成含有10μg/mL或20μg/mL Eh-ENVs的完全培养基(药物浓度根据预实验结果设置),继续培养24h。培养结束后,用PBS清洗细胞数次,在4℃下以1000r/min离心5min后弃上清,收集细胞沉淀。

2.3.3 RAW264.7细胞中炎症因子mRNA表达检测

采用RT-qPCR法检测细胞中TNF-α、IL-1β mRNA表达。将处于对数生长期的RAW264.7细胞接种于6孔板中,按“2.3.2”项下方法分组、给药、培养并收集细胞沉淀。采用Trizol试剂提取细胞中总RNA,检测其纯度和浓度后,将RNA逆转录合成cDNA,并以cDNA为模板进行PCR扩增。扩增条件为:95℃预变性30s;95℃变性15s,60℃退火15s,72℃延伸30s,40个循环。反应体系(共20μL)为:2×SYBR Green Mix 10μL,上、下游引物各0.4μL, cDNA模板2.0μL, ddH₂O 7.2μL。以Gapdh作为内参,采用2^{-ΔΔCt}法计算各目的基因mRNA的相对表达量。引物序列及扩增产物长度见表1。

表1 引物序列及扩增产物长度

目的基因	序列(5'→3')	扩增产物长度/bp
Gapdh	上游:CAGGAGCGAGACCCCACTAA	146
	下游:ATCACGCCACAGTTTCCAG	
Tnf-α	上游:CTATGGCCAGACCCTCACA	116
	下游:TCTTGACGGCAGAGAGGAGG	
Il-1β	上游:AGCTGGAGAGTGTGGATCCC	131
	下游:CCTGTCTGGCCGAGGACTA	
Il-10	上游:TTCITTCAAACAAGGACCAGC	125
	下游:GCAACCAAGTAACCTTAAAG	
Nrf2	上游:TAGATGACCATGAGTCGCTTGC	153
	下游:GCCAAACTTGCTCCATGTCC	
Ho-1	上游:AAGCCGAGAATGCTGAGTTCA	177
	下游:GCCGTGTAGATATGGTACAAGGA	
Nqo1	上游:AGGATGGGAGGTACTCGAATC	151
	下游:TGCTAGAGATGACTCGGAAGG	

2.3.4 RAW264.7细胞对Eh-ENVs的摄取能力考察

采用流式细胞术检测。将0.5mg/mL Eh-ENVs与1mmol/L DiD染料按照1000:1(V/V)的比例混合均匀,搅拌过夜;在4℃下以12000r/min离心60min去除游离染料,所得沉淀用PBS重悬,即得DiD@ENVs。取培养状态良好的RAW264.7细胞接种于6孔板中,常规培养,待其贴壁后,除去原培养基,用PBS漂洗细胞;将培养基换成含有10μmol/L DiD@ENVs的无血清培养基,继续共孵育0、3、6、9、12h。孵育结束后,除去培养基,用PBS洗涤细胞3次,收集细胞。用冷PBS重悬细胞后,上机检测并统计荧光强度,荧光强度越强表示细胞对Eh-ENVs的摄取能力越强。

2.3.5 RAW264.7细胞中ROS水平检测

采用流式细胞术检测。将RAW264.7细胞接种于6孔板中,按“2.3.2”项下方法分组、给药、培养并收集细胞沉淀。细胞沉淀用含有DCFH-DA探针的培养基重悬[将探针和基础培养基按1:1000(V/V)的比例混合],孵

育 30 min 后,用 PBS 漂洗 2~3 次,收集沉淀并用新的 Buffer 重悬。以未加探针的细胞作为阴性对照,上机检测并统计平均荧光强度,荧光强度越强表示细胞内 ROS 水平越高,提示细胞内氧化应激水平越高。

2.4 动物实验

2.4.1 Eh-ENVs 对正常小鼠肝脏的安全性评价

(1) 分组、给药与取材:实验设置正常组(NC 组, $n=6$)和 Eh-ENVs 组($n=4$)。Eh-ENVs 组小鼠尾静脉注射 4 mg/kg 的 Eh-ENVs(剂量参考前期预实验结果设置,下同),每天 1 次,持续 7 d。末次给药后,小鼠禁食不禁水过夜,用戊巴比妥钠麻醉小鼠后摘眼球取血,然后颈椎脱臼处死小鼠,立刻取心、肝、脾、肺、肾组织。将心、脾、肺、肾组织和部分肝组织置于 4% 多聚甲醛中固定,剩余肝组织置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。血液在室温静置 1 h 后,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液,置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

(2) 指标检测:①血清生化指标检测——取“2.4.1(1)”项下血清(每组取 4 只小鼠血清样本),按照试剂盒说明书方法操作,检测血清中 AST、ALT、Urea 和 Cr 水平。②组织病理形态学观察——取“2.4.1(1)”项下经 4% 多聚甲醛固定的心、肝、脾、肺、肾组织,常规制备石蜡切片(厚 5 μm),并进行常规 HE 染色,通过病理切片扫描仪观察各组织病理形态学变化。

2.4.2 Eh-ENVs 改善 APAP 诱导肝损伤的药效作用及机制研究

(1) 分组、造模、给药与取材:实验设置 NC 组[小鼠同“2.4.1(1)”项下]、APAP 组和 Eh-ENVs 组,每组 6 只。Eh-ENVs 组小鼠每天尾静脉注射 4 mg/kg 的 Eh-ENVs, NC 组和 APAP 组小鼠每天尾静脉注射等体积无菌 PBS,每天 1 次,持续 7 d。第 7 天给药 1 h 后,NC 组小鼠腹腔注射等体积生理盐水,其余 2 组小鼠腹腔注射 200 mg/kg APAP 诱导肝损伤^[13-14]。造模后小鼠禁食不禁水 24 h,然后按“2.4.1(1)”项下方法获取肝组织和血清样本。

(2) 指标检测:①血清生化指标检测——取处理好的血清,按照相应试剂盒说明书方法检测血清中 AST 和 ALT 水平。②肝组织病理形态学观察——取“2.4.2(1)”项下经 4% 多聚甲醛固定的肝组织,按照“2.4.1(2)”项下方法操作,观察肝组织的病理形态学变化。③肝组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 mRNA 表达——采用 RT-qPCR 法检测(每组取 4 个样本)。称取“2.4.2(1)”项下冻存的肝组织适量,后续检测步骤同“2.3.3”项下,引物序列及扩增产物长度见表 1。④肝组织中氧化应激指标检测——称取“2.4.2(1)”项下冻存的肝组织适量,研磨破碎后得到组织匀浆,离心取上清后使用 BCA 试剂盒进行定量。根据试剂盒说明书方法操作,测定肝组织中 MDA 和 SOD 水平。⑤肝组织中 Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA 表达检测——采用 RT-qPCR 法检测(每组取 4 个样本)。精

准称取“2.4.2(1)”项下冻存的肝组织适量,后续检测步骤同“2.3.3”项下,引物序列及扩增产物长度见表 1。⑥肝组织中 Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白表达检测——采用 Western blot 法检测。精确称取“2.4.2(1)”项下冻存的肝组织适量,提取组织中总蛋白并使用 BCA 试剂盒检测其浓度。取等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳并转膜,以 5% 脱脂牛奶封闭后,于特定的一抗(Nrf2、HO-1、NQO1 的稀释度均为 1:1 000, β -actin 的稀释度为 1:5 000)中孵育过夜,然后用特异性二抗进行印迹。采用化学发光液显影后采集图像,采用 Image J 软件分析目的条带灰度值,以目的蛋白与内参(β -actin)蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达量。

2.5 统计学方法

采用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行统计分析和制图。经 Shapiro-Wilk 检验,符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析和 LSD- t 检验,两样本间比较采用独立样本 t 检验;不符合正态分布的数据以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验(非参数检验),组间两两比较采用 Dunn 检验(Bonferroni 校正)。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 Eh-ENVs 的提取和表征结果

本研究从 500 g 新鲜全草中约提取到 20 mg Eh-ENVs。Eh-ENVs 的平均粒径为 179.2 nm,多分散指数为 0.347;表面呈负电荷,Zeta 电位为 -15.9 mV ;呈现典型的圆盘状(具体表征结果请扫描本文首页二维码,进入“增强出版”页面查看附图 1)。

3.2 细胞实验结果

3.2.1 Eh-ENVs 对两种细胞的毒性评价结果

如图 1 所示,在 0~100 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内,Eh-ENVs 对 RAW264.7 和 AML12 细胞的增殖几乎没有影响。

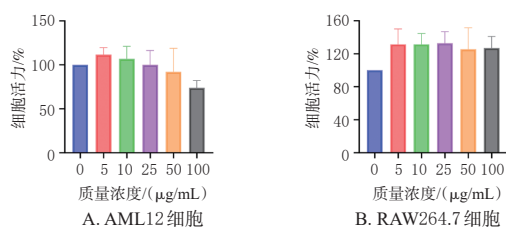


图 1 不同质量浓度 Eh-ENVs 对 AML12 和 RAW264.7 细胞的毒性评价结果($\bar{x} \pm s, n=4$)

3.2.2 Eh-ENVs 对 RAW264.7 细胞中炎症因子 mRNA 表达的影响

与正常组比较,模型组细胞中 TNF- α 、IL-1 β mRNA 表达水平均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,Eh-ENVs 低、高浓度组细胞中 TNF- α 、IL-1 β mRNA 表达水平均显著降低($P<0.05$)。结果见表 2。

表2 各组RAW264.7细胞中TNF- α 、IL-1 β mRNA表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	TNF- α	IL-1 β
正常组	1.00 \pm 0.15	1.00 \pm 0.11
模型组	2.32 \pm 0.14 ^a	3.10 \pm 0.22 ^a
Eh-ENVs低浓度组	1.70 \pm 0.18 ^b	2.26 \pm 0.30 ^b
Eh-ENVs高浓度组	1.42 \pm 0.07 ^b	1.78 \pm 0.09 ^b

a:与正常组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.2.3 RAW264.7细胞对Eh-ENVs的摄取能力考察结果

结果(图2)显示,与给药0 h比较,给药3~12 h后细胞的荧光强度均显著增强($P<0.05$),并且在给药后0~12 h内细胞荧光强度具有明显的时间依赖性趋势。

3.2.4 Eh-ENVs对RAW264.7细胞中ROS水平的影响

与正常组比较,模型组细胞中ROS水平显著升高($P<0.05$);与模型组比较,Eh-ENVs低、高浓度组细胞中ROS水平均显著降低($P<0.05$)。结果见图3。

3.3 动物实验结果

3.3.1 Eh-ENVs对正常小鼠的安全性评价结果

给药7 d后,与NC组比较,Eh-ENVs组小鼠血清中ALT、AST、Urea和Cr水平差异均无统计学意义($P>0.05$);心、肝、脾、肺、肾组织细胞排列整齐,细胞边界清晰,均未观察到异常病变。结果见表3(病理形态学观察结果请扫描本文首页二维码,进入“增强出版”页面查看附图2)。

3.3.2 Eh-ENVs对APAP诱导肝损伤小鼠血清中ALT、AST水平的影响

与NC组比较,APAP组小鼠血清中ALT、AST水平均显著升高($P<0.05$);与APAP组比较,Eh-ENVs组小鼠血清中ALT、AST水平均显著降低($P<0.05$)。结果见表4。

表3 安全性实验中各组小鼠血清生化指标水平比较($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	Urea/(mmol/L)	Cr/(μ mol/L)
NC组	16.21 \pm 6.72	364.89 \pm 134.69	10.10 \pm 0.66	145.47 \pm 4.57
Eh-ENVs组	43.89 \pm 18.70	295.46 \pm 102.09	9.29 \pm 0.37	144.66 \pm 4.85

表4 药效实验中各组小鼠血清生化指标水平比较($\bar{x} \pm s, n=6, U/L$)

组别	ALT	AST
NC组	51.98(47.97,60.68)	112.08(54.57,159.50)
APAP组	22 450.55(19 072.36,27 550.07) ^a	13 207.39(10 544.73,17 052.34) ^a
Eh-ENVs组	7 239.00(6 249.87,8 716.93) ^b	8 984.76(6 108.74,11 458.47) ^b

a:与NC组比较, $P<0.05$;b:与APAP组比较, $P<0.05$ 。

3.3.3 Eh-ENVs对APAP诱导肝损伤小鼠肝组织病理形态学的影响

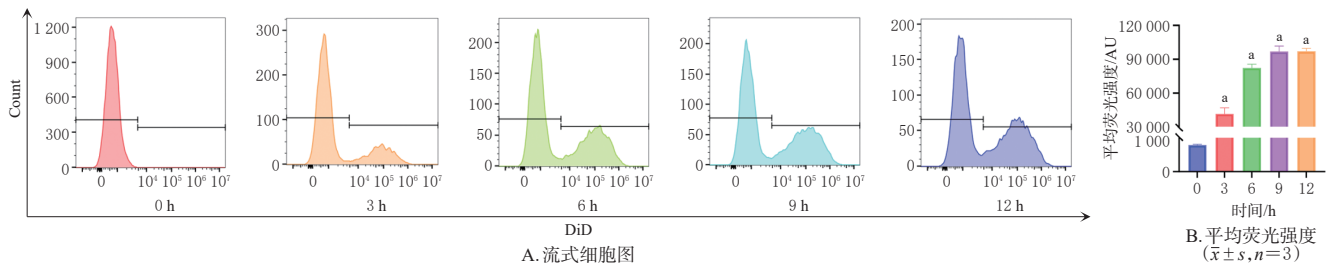
NC组小鼠肝细胞形态正常,肝小叶结构清晰且排列整齐,无明显病理异常;与NC组比较,APAP组小鼠肝组织细胞界限模糊、排列紊乱,出现了明显的炎症细胞浸润和细胞损伤现象;与APAP组比较,Eh-ENVs组小鼠肝组织细胞界限相对清晰、排列相对整齐,炎症细胞浸润和细胞损伤现象明显改善。结果见图4。

3.3.4 Eh-ENVs对APAP诱导肝损伤小鼠肝组织中炎症因子mRNA表达的影响

与NC组比较,APAP组小鼠肝组织中TNF- α 、IL-1 β mRNA表达均显著上调($P<0.05$),IL-10 mRNA表达显著下调($P<0.05$);与APAP组比较,Eh-ENVs组小鼠肝组织中TNF- α 、IL-1 β mRNA表达均显著下调($P<0.05$),IL-10 mRNA表达显著上调($P<0.05$)。结果见表5。

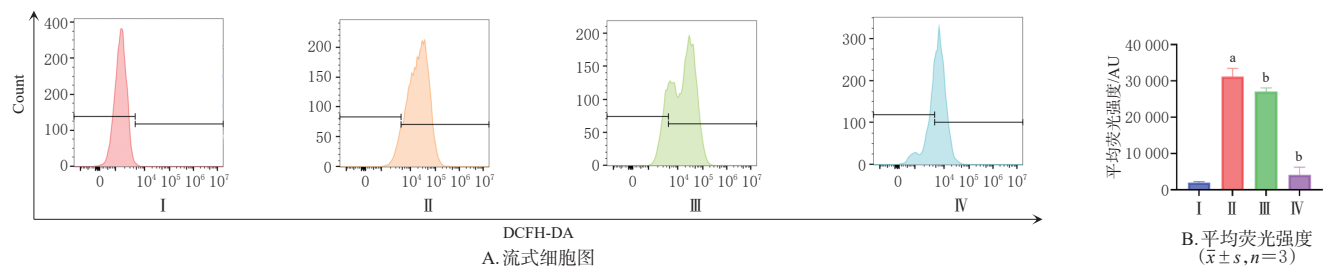
3.3.5 Eh-ENVs对APAP诱导肝损伤小鼠肝组织中氧化应激指标的影响

与NC组比较,APAP组小鼠肝组织中SOD水平显著降低($P<0.05$),MDA水平显著升高($P<0.05$);与



a:与给药0 h比较, $P<0.05$ 。

图2 给药不同时间后RAW264.7细胞对Eh-ENVs的摄取能力考察结果



I:正常组;II:模型组;III:Eh-ENVs低浓度组;IV:Eh-ENVs高浓度组;a:与正常组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

图3 各组细胞中ROS水平测定的流式细胞图及平均荧光强度测定结果

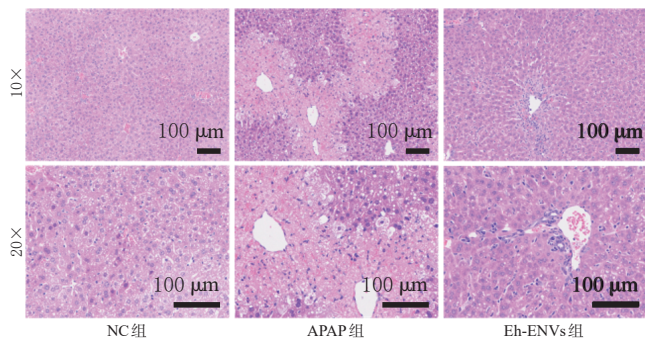


图4 各组小鼠肝组织病理形态学观察显微图

表5 各组小鼠肝组织中炎症因子 mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	TNF- α	IL-1 β	IL-10
NC组	1.00 \pm 0.63	1.00 \pm 0.34	1.00 \pm 0.64
APAP组	2.37 \pm 0.54 ^a	7.55 \pm 1.57 ^a	0.14 \pm 0.07 ^a
Eh-ENVs组	0.92 \pm 0.77 ^b	2.14 \pm 1.33 ^b	3.12 \pm 2.12 ^b

a: 与NC组比较, $P < 0.05$; b: 与APAP组比较, $P < 0.05$ 。

APAP组比较, Eh-ENVs组小鼠肝组织中SOD水平显著升高($P < 0.05$), MDA水平显著降低($P < 0.05$)。结果见表6。

表6 各组小鼠肝组织中SOD、MDA水平比较($\bar{x} \pm s, n=6, U/mg \text{ prot}$)

组别	SOD	MDA
NC组	40.63 \pm 3.97	1.29 \pm 0.40
APAP组	30.64 \pm 2.54 ^a	3.18 \pm 0.75 ^a
Eh-ENVs组	36.62 \pm 3.94 ^b	1.33 \pm 0.32 ^b

a: 与NC组比较, $P < 0.05$; b: 与APAP组比较, $P < 0.05$ 。

3.3.6 Eh-ENVs对APAP诱导肝损伤小鼠肝组织中Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA及其蛋白表达的影响

与NC组比较, APAP组小鼠肝组织中Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA及其蛋白表达均显著下调($P < 0.05$); 与APAP组比较, Eh-ENVs组小鼠肝组织中Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA及其蛋白表达均显著上调($P < 0.05$)。结果见图5、表7。

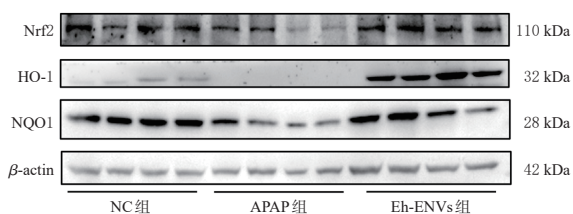


图5 各组小鼠肝组织中Nrf2、HO-1、NQO1蛋白表达的电泳图

表7 各组小鼠肝组织中Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA及其蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	Nrf2		HO-1		NQO1	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
NC组	1.00 \pm 0.61	1.00 \pm 0.14	1.00 \pm 0.65	1.00 \pm 0.58	1.00 \pm 0.34	1.00 \pm 0.14
APAP组	0.18 \pm 0.03 ^a	0.61 \pm 0.15 ^a	0.32 \pm 0.18 ^a	0.48 \pm 0.15 ^a	0.11 \pm 0.02 ^a	0.50 \pm 0.10 ^a
Eh-ENVs组	0.95 \pm 0.20 ^b	0.86 \pm 0.10 ^b	2.95 \pm 2.34 ^b	4.37 \pm 1.34 ^b	1.18 \pm 0.07 ^b	0.74 \pm 0.09 ^b

a: 与NC组比较, $P < 0.05$; b: 与APAP组比较, $P < 0.05$ 。

4 讨论

本研究在既往研究^[11-12]基础上, 通过条件优化建立了Eh-ENVs的分离纯化体系, 并采用组织破碎、差速离心除杂、逐级过滤联合超速离心等方法, 成功获得了形态典型、分散性与稳定性良好的高纯度植物源性外泌体纳米囊泡——Eh-ENVs, 为后续体内外功能研究奠定了可靠的材料基础。

安全性是外泌体囊泡应用的核心前提^[15]。本研究结果显示, Eh-ENVs在体外对AML12细胞和RAW264.7细胞均无明显毒性; 在体内对小鼠主要脏器无明显损伤, 对肝肾功能指标均无明显影响。上述结果提示, Eh-ENVs在体内外的安全性良好, 具备开展后续药效研究的条件。同时, 细胞摄取结果表明, RAW264.7细胞对Eh-ENVs的摄取呈时间依赖性增强趋势, 表明Eh-ENVs可被细胞持续内化, 这为其在细胞水平持续发挥生物学效应提供了重要的细胞学依据。基于上述良好的安全性与细胞摄取特性, 本研究在APAP诱导的肝损伤小鼠模型中进一步验证其药效。结果显示, Eh-ENVs可显著降低血清中ALT、AST水平, 并减轻肝组织病理损伤与炎症细胞浸润, 提示Eh-ENVs具有显著的保肝作用。

大量研究证实, 巨噬细胞活化及促炎/抗炎因子失衡在DILI的炎症放大过程中扮演核心角色, 因此抑制过度炎症、重塑炎症微环境是减轻DILI的重要策略^[16]。IL-1 β 、TNF- α 作为经典的促炎因子, 可介导肝内炎症级联反应; IL-10作为重要的抗炎因子, 能够抑制过度炎症反应并参与损伤修复; 三者共同调控炎症微环境稳态^[17]。值得注意的是, 尽管APAP与LPS诱导炎症损伤的初始启动机制不同, 但二者介导的病理过程均依赖巨噬细胞的活化及共同炎症信号通路^[18]。因此, LPS诱导的巨噬细胞炎症模型可有效模拟APAP诱导肝损伤过程中的炎症效应阶段。基于此, 本研究进一步引入LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞炎症模型, 设计体外实验验证Eh-ENVs的抗炎作用。本研究结果显示, 在体内外实验中, Eh-ENVs可下调细胞/肝组织中IL-1 β 、TNF- α mRNA表达, 上调细胞/肝组织中IL-10 mRNA表达, 提示Eh-ENVs可有效抑制炎症反应, 促进细胞/肝组织从炎症状态向修复状态转化。

氧化应激是APAP诱导的肝损伤的核心驱动因素^[16]。其不仅作为DILI的启动因子, 更与炎症反应形成相互加剧的恶性循环^[19]。SOD水平反映内源性抗氧化储备能力, MDA水平代表脂质过氧化损伤程度, 二者是评价体内氧化应激水平的经典指标^[20]; ROS水平则直接反映巨噬细胞的氧化应激负荷^[21]。本研究结果显示, Eh-ENVs在体内可显著升高SOD表达, 降低MDA表达, 在体外可有效清除细胞内ROS。这提示Eh-ENVs可通过抑制氧化应激, 从而发挥保肝作用。

为进一步阐明Eh-ENVs改善APAP诱导肝损伤的分子机制, 本研究聚焦Nrf2/HO-1/NQO1通路进行了探

讨。Nrf2作为内源性抗氧化防御系统的关键调控枢纽,在氧化应激状态下可发生核转位,启动*HO-1*和*NQO1*等抗氧化靶基因的表达,进而增强组织抗氧化能力、缓解肝损伤^[22]。研究表明,激活Nrf2/HO-1/NQO1通路可有效缓解药物诱导的急性肝损伤^[23]。本研究体内外结果显示,Eh-ENVs可显著上调细胞/肝组织中Nrf2、HO-1、NQO1的mRNA及其蛋白表达。这提示Eh-ENVs可激活Nrf2/HO-1/NQO1通路,重建肝脏抗氧化防御体系,进而发挥抗炎、抗氧化及保肝作用。

综上所述,Eh-ENVs可通过激活Nrf2/HO-1/NQO1通路,抑制炎症反应并减轻氧化应激,进而改善APAP诱导的肝损伤。但本研究仍存在一定的局限性:尚未设置临床阳性对照药物,难以全面评价Eh-ENVs的相对疗效。后续可增设Eh-ENVs多剂量组和阳性对照组,进一步验证其疗效与安全性,并深入探讨Nrf2上游调控分子与其他交叉通路的协同机制。

参考文献

[1] 马世武,刘成海,刘晓琰,等.中国药物性肝损伤诊治指南:2023年版[J].胃肠病学,2023,28(7):397-431.

[2] SHEN T, LIU Y, SHANG J, et al. Incidence and etiology of drug-induced liver injury in mainland China[J]. Gastroenterology, 2019, 156(8):2230-2241.e11.

[3] CHILVERY S, YELNE A, KHURANA A, et al. Acetaminophen induced hepatotoxicity: an overview of the promising protective effects of natural products and herbal formulations[J]. Phytomedicine, 2023, 108:154510.

[4] RAMACHANDRAN A, AKAKPO J Y, CURRY S C, et al. Clinically relevant therapeutic approaches against acetaminophen hepatotoxicity and acute liver failure[J]. Biochem Pharmacol, 2024, 228:116056.

[5] ALRASHED M, ALYOUSEF A, BADRELDIN H A, et al. Comparison of three-bag method acetylcysteine versus two-bag method acetylcysteine for the treatment of acetaminophen toxicity: an updated systematic review and meta-analysis[J]. Diseases, 2024, 12(12):332.

[6] JAESCHKE H, RAMACHANDRAN A. Acetaminophen hepatotoxicity: paradigm for understanding mechanisms of drug-induced liver injury[J]. Annu Rev Pathol, 2024, 19:453-478.

[7] YOUNIS N S, ABDELNABY R M, MOHAMED M E. Hepatoprotective effects of linalool against liver ischemia-reperfusion: the role of Nrf2/HO-1/NQO1 and TLR4/RAGE/NF- κ B pathways[J]. Eur Rev Med Pharmacol, 2023, 27(20):10094-10111.

[8] 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.

[9] 庞玉新,张新蕊,于福来,等.大飞扬总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性测定[J].广西植物,2015,35(1):115-119.

[10] DAD H A, GU T W, ZHU A Q, et al. Plant exosome-like

nanovesicles: emerging therapeutics and drug delivery nanoplatforms[J]. Mol Ther, 2021, 29(1):13-31.

[11] KUMAR J, SHRIVASTAVA D M, JORIYA A. Synergistic gastroprotective, hepatoprotective, and antioxidant activities of ethanolic leaf extracts of *Achyranthes aspera* and *Euphorbia hirta*: a comprehensive phytochemical and pharmacological study[J]. Am J Psychiatr Rehabil, 2025, 28(2):120-130.

[12] 吴嘉宇,张泓.虎杖来源外泌体的提取、纯化及鉴定技术[J].安徽医科大学学报,2025,60(11):2076-2082.

[13] 蔡秀萍.巴戟天纳米颗粒提取方法比较和对BV2细胞凋亡的影响[D].广州:广州中医药大学,2021.

[14] JADEJA R N, URRUNAGA N H, DASH S, et al. Withaferin: a reduces acetaminophen-induced liver injury in mice[J]. Biochem Pharmacol, 2015, 97(1):122-132.

[15] QI H, YANG L, LI X, et al. Exosomes separated based on the "STOP" criteria for tumor-targeted drug delivery[J]. J Mater Chem B, 2018, 6(18):2758-2768.

[16] LI Q, CHEN F, WANG F. The immunological mechanisms and therapeutic potential in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity[J]. Cell Biosci, 2022, 12:187.

[17] LI L, LI X, ZHANG F. The pivotal role of cytokines in liver disease pathogenesis and therapeutic potential[J]. Frontiers Immunol, 2025, 17(16):1694582.

[18] CHAO S, SHAN S, LIU Z, et al. Both TREM2-dependent macrophages and kupffer cells play a protective role in APAP-induced acute liver injury[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 141:112926.

[19] LIU W, HUAN L, ZHANG C, et al. Amelioration of acetaminophen-induced hepatic oxidative stress and inflammation by RNAi targeting Cyp2e1 *in vivo*[J]. Curr Issues in Mol Biol, 2025, 47(5):372.

[20] POLJŠAK B, JAMNIK P, MILISAV I. The importance of multifaceted approach for accurate and comprehensive evaluation of oxidative stress status in biological systems[J]. Antioxidants (Basel), 2025, 14(9):1083.

[21] WEINBERG S E, CHANDEL N S. Mitochondria reactive oxygen species signaling in immune responses[J]. Immunity, 2025, 58(8):1904-1921.

[22] LADDHA A P, WU H, MANAUTOU J E. Deciphering acetaminophen-induced hepatotoxicity: the crucial role of transcription factors like nuclear factor erythroid 2-related factor 2 as genetic determinants of susceptibility to drug-induced liver injury[J]. Drug Metab Dispos, 2024, 52(8):740-753.

[23] DONG Y, JIA R, JIANG Y, et al. SMND-309 activates Nrf2 signaling to alleviate acetaminophen-induced hepatotoxicity and oxidative stress[J]. PLoS One, 2025, 20(3):e0310879.

(收稿日期:2026-03-04 修回日期:2026-04-28)

(编辑:林静)