

小柴胡颗粒激活 Nrf2 通路抗 TAA 致大鼠
急性肝损伤的机制探讨

贾为壹，刘佳佳，胡睿，胡安玲，徐尚福，王欢，罗果，李晋*

(遵义医科大学 医学与生物学研究中心，基础药理教育部重点实验室暨特色民族药教育部国际合作
联合实验室 贵州省普通高等学校脑科学特色重点实验室，贵州 遵义 563003)

〔摘要〕 目的:观察小柴胡颗粒对硫代乙酰胺(TAA)致大鼠急性肝损伤(ALI)的治疗作用,探讨核转录因子(NF)-E2 相关因子 2(Nrf2)抗氧化损伤通路在其中的作用。方法:SD 大鼠随机分为空白组,模型组,小柴胡颗粒低、中、高剂量组(1,2,4 g·kg⁻¹),大鼠给予 250 mg·kg⁻¹ TAA 腹腔注射 2 d 制备肝损伤模型,从第 3 天各组分别给予等量双蒸水和不同剂量小柴胡颗粒,灌胃 2 周。末次给药后 24 h 取材,肝组织行苏木素-伊红(HE)染色;比色法测定血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST)活性及组织中总超氧化物歧化酶(T-SOD),丙二醛(MDA)水平;实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测 Nrf2 通路相关 mRNA 表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Nrf2 通路相关蛋白的表达。结果:与空白组比较,模型组 ALT,AST,MDA 水平显著增高,T-SOD 活性明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),病理学呈现大片炎症浸润表现,肝脏组织 Nrf2, Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(Keap1),醌氧化还原酶 1(NQO1),血红素加氧酶-1(HO-1),谷氨酸半胱氨酸合成酶催化亚基(GCLC),谷氨酸半胱氨酸合成酶调节亚基(GCLM)mRNA 及蛋白表达水平均明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,小柴胡颗粒各剂量组 ALT,AST,MDA 水平均明显降低,T-SOD 活性明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),病理结果示大鼠肝脏病变范围与严重程度均有不同程度改善,肝脏组织 Nrf2,Keap1,NQO1,HO-1,GCLC,GCLM 的 mRNA 及蛋白表达水平均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:小柴胡颗粒可能通过上调 Nrf2 信号通路上下游分子的表达,对 TAA 致急性肝损伤大鼠起到治疗作用。

〔关键词〕 小柴胡汤;急性肝损伤;氧化应激;转录因子 NF-E2 相关因子 2(Nrf2) 通路
〔中图分类号〕 R289;R575.1;944.2+7 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2019)08-0054-06
〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfjx.20190840
〔网络出版地址〕 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190102.1039.007.html>
〔网络出版时间〕 2019-01-04 11:13

Therapeutic Mechanism of Xiaochaihu Granule on Acute Liver Injury Induced by
Thioacetamide in Rats Through Nrf2 Pathway

JIA Wei-yi, LIU Jia-jia, HU Rui, HU An-ling, XU Shang-fu, WANG Huan, LUO Guo, LI Jin*
(Research Center for Medicine & Biology Key Lab for Basic Pharmacology of Ministry of
Education and Joint International Research Laboratory of Ethnomedicine, Key Laboratory of
Brain Science, Zunyi Medical University, Zunyi, 563003, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To observe the therapeutic effect of Xiaochaihu granule on acute liver injury (ALI) induced by thioacetamide (TAA) in rats, and to explore the role of transcription factor (NF)-E2 related factor 2 (Nrf2) in the pathway of oxidative damage. **Method:** SD rats were randomly divided into control group, model group, Xiaochaihu granule low, middle and high dose groups (1, 2, 4 g·kg⁻¹). 250 mg·kg⁻¹ TAA was

〔收稿日期〕 20181017
〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(81360661)
〔第一作者〕 贾为壹,在读硕士,从事中西医结合治疗肝脏相关疾病研究,E-mail:vickyj1@163.com
〔通信作者〕 *李晋,副教授,硕士生导师,从事中西医结合治疗消化系统疾病研究,E-mail:lijin010502@163.com

given to the rats by *ip.* administration for 2 days to prepare the liver injury model, and from the 3rd day, same amount of double distilled water or different doses of Xiaochaihu granule was given to corresponding groups by *g.* administration for 2 weeks. 24 hours after the last administration, liver tissues were taken and stained with hematoxylin-eosin (HE) staining. The activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum were measured by colorimetry. The activities of total superoxide dismutase (T-SOD) and malondialdehyde (MDA) in liver tissues were measured by colorimetry. Real-time PCR was used to detect Nrf2 pathway related mRNA expression. **Result:** As compared with control group, ALT, AST and MDA in model group were significantly increased, while T-SOD was significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and pathological features showed large inflammatory infiltration, both mRNA and protein expression levels of Nrf2, Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), quinone oxidoreductase (NQO1), heme oxygenase-1 (HO-1), glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) and glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCLM) were decreased to different degrees ($P < 0.01$). As compared with model group, ALT, AST, MDA levels in Xiaochaihu granule treatment groups were decreased, while T-SOD was increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Pathological results showed that the range and severity of liver lesions in rats were improved to varying degrees after treatment, both mRNA and protein expression levels of Nrf2, Keap1, NQO1, HO-1, GCLC and GCLM were increased to varying degrees ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Xiaochaihu granule may play a therapeutic role in TAA induced ALI in rats by up-regulating the expression of downstream molecules in Nrf2 signaling pathway.

[**Key words**] Xiao Chaihutang; acute liver injury; oxidative stress; transcription factor NF-E2 related factor 2 (Nrf2) pathway

急性肝损伤是指由于病毒感染,过量服用药物、乙醇、食物添加剂等原因引起的肝细胞变性、坏死及凋亡等^[1]。目前治疗肝损伤有多种方法,且中药治疗肝损伤逐渐成为研究热点。目前发现丹参^[2]、水飞蓟宾等中药单味药及复方肝宁颗粒,复方枳椇子等复方中药均可有效治疗急性肝损伤^[3-5]。有研究认为这些中药的治疗机制多与其抗氧化作用有关^[6]。近年来研究发现肝脏的急性慢性损伤多与氧化应激有关,氧化应激可导致肝细胞线粒体功能异常并产生过量活性氧簇(ROS),从而进一步损伤肝脏^[7]。硫代乙酰胺是一种含硫化合物其代谢产物共价结合肝脏大分子,产生过多的 ROS,导致氧化和抗氧化系统的失衡,进而损伤肝细胞超微结构,诱导细胞死亡^[8]。小柴胡汤出自《伤寒杂病论》,现代研究表明,小柴胡汤具有显著的抗炎保肝、解热镇痛等作用,在临床上主要用于治疗慢性乙型肝炎、肝纤维化、预防肝癌,是日本汉方药中产量最大和用量最多的方剂^[9]。越来越多的研究证明小柴胡汤在肝脏疾病中发挥抗氧化作用^[10],而核转录因子(NF)-E2 相关因子 2(Nrf2)是机体质量要的抗氧化信号通路^[11],但小柴胡汤对急性肝损伤的保护作用是否通过调控 Nrf2 抗氧化通路发挥作用,目前国内外鲜有报道。同时课题组前期研究发现小柴胡汤可通过激活 Nrf2 氧化应激通路减少肝细胞坏死和增强肝脏

功能,进而有效治疗大鼠肝纤维化^[12-14]。小柴胡颗粒是采用张仲景《伤寒杂病论》中记载的“去滓再煎法”制备的小柴胡固体汤剂,本研究旨在观察小柴胡颗粒对硫代乙酰胺(TAA)所致大鼠急性肝损伤的治疗作用,并探讨其机制是否与 Nrf2 氧化应激信号通路有关,为复方中药治疗急性肝损伤的研究提供实验依据。

1 材料
1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠 50 只,体质量 180 ~ 220 g,购自第三军医大学实验动物中心,合格证号 SCXK(军)2012-0011,饲养于遵义医学院基础药理省部共建教育部重点实验室 SPF 级实验动物房,饲养温度 20 ~ 24 ℃,湿度 40% ~ 60%,12/12 h 光照黑暗循环,自由摄食饮水,动物使用许可证号 SYXK(黔)2014-003,由遵义医学院实验动物伦理委员会审核通过。
1.1 药物及试剂 小柴胡颗粒(广州二化白云山光华制药股份有限公司生产小柴胡颗粒,含二化柴胡 1.5 g,黄芩片 0.56 g,党参片 0.56 g,法半夏 0.56 g,甘草片 0.56 g,生姜 0.56 g,大枣 0.56 g,批号 K70079)。根据 2015 版《中国药典》,采用黄芩苷作为小柴胡颗粒测定的指标,课题组前期使用高效液相色谱法(HPLC)测量小柴胡颗粒黄芩苷含量为 2.430 7 g·kg⁻¹^[14],满足不少于 2 g·kg⁻¹ 的

要求^[15]；TAA（美国 Sigma 公司，批号 BCBR6159V）；丙氨酸氨基转移酶（ALT），门冬氨酸氨基转移酶（AST），丙二醛（MDA），总超氧化物歧化酶（T-SOD）比色法测试盒（南京建成生物工程研究所，批号分别为 20180907，20180910，20180726，20180726）；total RNA 提取试剂，实时荧光定量 PCR（Real-time PCR）试剂盒（大连 Takara 公司，批号分别为 AI51024A，AK5801）；iQTM SYBR[®] Green SuperMix 荧光试剂盒（美国 Bio-Rad 公司，批号 64148508）；BCA 试剂盒（上海捷瑞生物工程有限公司，批号 501G05）；Nrf2，Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1（Keap1），醌氧化还原酶 1（NQO1），血红素加氧酶-1（HO-1），谷氨酸半胱氨酸合成酶催化亚基（GCLC），谷氨酸半胱氨酸合成酶调节亚基（GCLM）多克隆抗体（美国 Abcam 公司，批号分别为 GR298097-4，GR27823-1，GR100133-1，GR21142-1，GR282758-2，GR74230-8）； β -肌动蛋白（ β -actin）小鼠多克隆抗体，辣根过氧化物酶（HRP）标记山羊抗兔免疫球蛋白（Ig）G，HRP 标记山羊抗小鼠 IgG（武汉三鹰生物技术有限公司，批号分别为 SA6609-1-1g，SA00001-1，SA00001-2）；RIPA 裂解液，苏木素-伊红（HE）染色液（北京索莱宝科技有限公司，批号分别为 R0010，G1120）；蛋白上样缓冲液，样品还原剂，彩色预染蛋白质 Marker〔赛默飞世尔科技（中国）有限公司，批号分别为 1904557，1909046，0067484〕；免疫印迹化学发光试剂（上海七海复泰生物科技有限公司，批号 20180318）；PCR 引物由生工生物工程（上海）股份有限公司设计合成，序列见表 1。

1.2 仪器 CFX Connect 型荧光定量 PCR 仪，PowerPac 型电泳仪，Trans-Blot Turbo 型半干转膜仪，ChemiDoc Touch 型凝胶成像仪，Mini PROTEAN Tetra 型凝胶垂直电泳槽（美国 Bio-Rad 公司）；1510 型全波长酶标仪，2000 型微量紫外可见分光光度计（美国 Thermo Scientific 公司）；RM2245 型转轮式切片机，TP1020 型自动组织脱水机（德国 Leica 公司）；3000 型匀浆机（美国 Dremel 公司）。

2 方法

2.1 造模、分组及给药 适应性喂养 1 周后，随机分为 5 组，分别为空白组，模型组（TAA），小柴胡颗粒低、中、高剂量组（1，2，4 g·kg⁻¹），每组 10 只，根据大鼠和人的等效剂量转换选择剂量，分别相当于临床最高剂量的 0.5，1，2 倍^[15]，大鼠隔日腹腔注射 TAA 250 mg·kg⁻¹ 连续 2 d 造模^[16]，空白组以同样

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Nrf2	上游 TTGGCAGAGACATTCCCATTTGTA	116
	下游 GAGCTATCGAGTGACTGAGCCTGA	
Keap1	上游 CATCGGCATCGCCAACTTC	119
	下游 GCTGGCAGTGTGACAGGTTGA	
NQO1	上游 TGGAAGCTGCAGACCTGGTG	130
	下游 CCCTTGTGCATACATGGTGiGCATAC	
HO-1	上游 AGGTGCACATCCGTGCAGAG	120
	下游 CTTCAGGGCCGTATAGATATGGTA	
GCLC	上游 CTGCACATCTACCACGCAGTCA	129
	下游 ATCGCCGCCATTCACTAGTAACAA	
GCLM	上游 AGACCGGGAACCTGCTCAAC	113
	下游 GATTTGGGAGCTCCATTTCATTCA	
β -actin	上游 GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	150
	下游 GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG	

方法注射等体积生理盐水。其中大鼠体质量明显减轻是判断造模成功的主要观察指标。第 3 天开始小柴胡颗粒治疗组分别按对应剂量灌胃给药，1 次/d，连续给药 2 周。空白组、模型组给予等量双蒸水。给药 2 周后将全部大鼠禁食 12 h，次日以 7% 水合氯醛麻醉，腹主动脉采血，冰上迅速取肝组织。

2.2 HE 染色观察肝组织病理学变化 取新鲜同部位肝脏，10% 甲醛固定，乙醇梯度脱水，二甲苯透明后石蜡包埋，切片，二甲苯脱蜡，梯度乙醇水化，常规 HE 染色，光学显微镜下观察。

2.3 比色法检测血清中 ALT，AST 活性 大鼠麻醉后腹主动脉取血，3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min 取血清，测定血清中 ALT 和 AST 的活性。

2.4 比色法检测肝组织中 MDA，T-SOD 水平 取相同部位肝大叶组织，制成 10% 的匀浆，3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min 取上清，按试剂盒说明书测定 MDA 和 T-SOD 水平。

2.5 Real-time PCR 检测肝组织中 Nrf2，Keap1，NQO1，HO-1，GCLC，GCLM mRNA 的表达 称取约肝组织 100 mg，用 trizol 1 mL 裂解，总 RNA 提取按照 RNeasy 试剂盒说明书操作。总 RNA 浓度用 ND-2000 微量紫外可见分光光度计检测 RNA 的含量，当吸光度 A₂₆₀/A₂₈₀ > 1.8 RNA 纯度符合要求。采用高容量逆转录试剂盒进行逆转录，应用 Power SYBR Green Master Mix 进行 PCR 定量，反应参数为 95 ℃ 3 min，95 ℃ 10 s，60 ℃ 45 s，共 40 个循环。结果

采用相对定量法进行分析^[17],用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示 mRNA 的相对表达量。

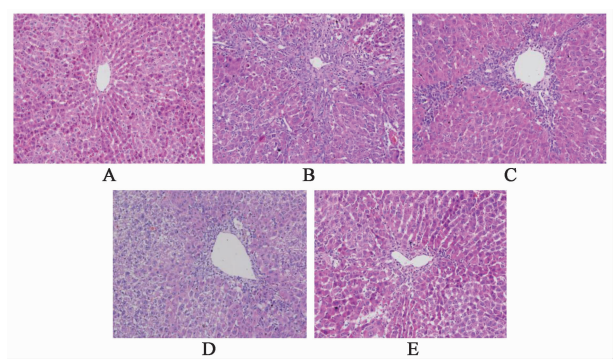
2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测肝组织 Nrf2, Keap1, NQO1, HO-1, GCLC, GCLM 蛋白的表达

取肝脏组织 500 mg 加裂解液 1 mL,匀浆,冰上裂解 30 min,用 BCA 方法进行蛋白定量。加入蛋白上样缓冲液变性 10 min,70 V 跑胶。半干转法转膜 30 min,用 TBST 洗 PVDF 膜 3 次,每次 10 min,用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,取出后 TBST 洗膜 4 次,每次 10 min。一抗孵育(1:1 000),4 ℃ 过夜。TBST 洗膜 4 次,每次 10 min。二抗(1:5 000)室温孵育 1 h, TBST 洗膜 4 次,每次 10 min。ECL 化学发光剂曝光,采用 Quantity One 软件进行结果计算。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 18.0 软件进行数据分析,采用单因素方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠肝组织病理的影响 空白组大鼠肝小叶清晰完整,未见肝细胞变性坏死,肝索围绕中央静脉呈放射状排列,肝窦未见充血、水肿等。模型组大鼠肝小叶正常结构被破坏,肝索断裂,肝细胞排列紊乱且见大量单核细胞、淋巴细胞、嗜酸粒细胞等炎症细胞浸润。小柴胡颗粒各剂量组的肝组织破坏情况可见不同程度的改善。见图 1。



A. 空白组;B. 模型组;C. 小柴胡颗粒低剂量组;D. 小柴胡颗粒中剂量组;E. 小柴胡颗粒高剂量组(图 2 同)

图 1 小柴胡颗粒对大鼠肝脏病理形态的影响 (HE, ×200)
Fig.1 Effect of Xiaochaihu granule on pathological section of liver in rats (HE, ×200)

3.2 对大鼠血清 ALT,AST 活性的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清 ALT,AST 活性显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,小柴胡颗粒低、中、高剂量组 ALT,AST 活性均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

3.3 对大鼠肝组织 MDA, T-SOD 水平的影响 与

表 2 小柴胡颗粒对硫代乙酰胺诱导大鼠急性肝损伤血清 ALT, AST 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Xiaochaihu granule on serum ALT and AST in rats with acute liver injury induced by thioacetamide($\bar{x} \pm s$) U·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	ALT	AST
空白	—	7	34.445 ± 5.860	35.911 ± 6.742
模型	—	6	373.195 ± 21.371 ¹⁾	271.603 ± 66.675 ¹⁾
小柴胡颗粒	1	6	150.449 ± 49.178 ³⁾	141.390 ± 59.859 ²⁾
	2	6	114.132 ± 42.989 ³⁾	132.347 ± 46.495 ³⁾
	4	5	142.621 ± 24.397 ³⁾	128.600 ± 46.495 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 5 同)。

空白组比较,模型组大鼠肝组织 MDA 含量显著升高,T-SOD 活性显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,小柴胡颗粒低、中、高剂量组 MDA 含量明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$),T-SOD 活性显著降低 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 小柴胡颗粒对硫代乙酰胺诱导大鼠急性肝损伤肝组织 MDA, T-SOD 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of Xiaochaihu granule on MDA and T-SOD in liver tissues in rats with acute liver injury induced by thioacetamide ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	MDA/μmol·g ⁻¹	T-SOD/U·mg ⁻¹
空白	—	7	7.095 ± 0.750	125.750 ± 8.314
模型	—	6	13.484 ± 2.229 ¹⁾	92.599 ± 5.838 ¹⁾
小柴胡颗粒	1	6	11.268 ± 1.672 ²⁾	104.349 ± 1.731 ³⁾
	2	6	10.058 ± 1.625 ³⁾	108.310 ± 0.957 ³⁾
	4	5	10.304 ± 2.099 ²⁾	113.613 ± 1.704 ³⁾

3.4 对大鼠肝组织 Nrf2 信号通路相关 mRNA 的影响 与空白组比较,模型组大鼠肝组织 Nrf2, Keap1, NQO1, GCLC 和 GCLM mRNA 水平均显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,小柴胡颗粒低、中、高剂量组 Nrf2, Keap1, NQO1, GCLC 和 GCLM mRNA 水平均明显升高 ($P < 0.05$)。见表 4,5。

3.5 对大鼠肝组织 Nrf2 信号通路相关蛋白的影响

与空白组比较,模型组大鼠肝组织 Nrf2, Keap1, HO-1, GCLC 和 GCLM 蛋白水平均明显降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,小柴胡颗粒低、中、高剂量组大鼠肝脏组织 Nrf2, Keap1, HO-1, GCLC 和 GCLM 蛋白均明显升高 ($P < 0.05$)。见图 2 及表 6,7。

4 讨论

急性肝损伤引发肝细胞炎症、变性或坏死,导致

表 4 小柴胡颗粒对硫代乙酰胺诱导大鼠急性肝损伤肝组织 Nrf2, Keap1,NQO1 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of Xiaochaihu granule on mRNA expression of Nrf2, Keap1, NQO1 in liver tissues in rats with acute liver injury induced by thioacetamide($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	Nrf2	Keap1	NQO1
空白	—	7	1	1	1
模型	—	6	0.333 ± 0.056 ¹⁾	0.207 ± 0.046 ¹⁾	1.100 ± 0.336 ¹⁾
小柴胡颗粒	1	6	0.470 ± 0.057 ³⁾	0.316 ± 0.058 ²⁾	0.935 ± 0.158
	2	6	0.710 ± 0.096 ³⁾	0.422 ± 0.035 ³⁾	1.026 ± 0.414 ³⁾
	4	5	0.744 ± 0.099 ³⁾	0.530 ± 0.126 ³⁾	1.019 ± 0.496 ³⁾

表 5 小柴胡颗粒对硫代乙酰胺诱导大鼠急性肝损伤肝组织 HO-1, GCLC,GCLM mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of Xiaochaihu granule on mRNA expression of HO-1, GCLC, GCLM in liver tissues in rats with acute liver injury induced by thioacetamide($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	HO-1	GCLC	GCLM
空白	—	7	1	1	1
模型	—	6	0.210 ± 0.132	0.244 ± 0.070 ¹⁾	0.231 ± 0.090 ¹⁾
小柴胡颗粒	1	6	0.352 ± 0.033	0.388 ± 0.104	0.362 ± 0.066 ³⁾
	2	6	0.584 ± 0.151	0.516 ± 0.056 ³⁾	0.640 ± 0.231 ³⁾
	4	5	0.691 ± 0.072	0.803 ± 0.223 ³⁾	0.701 ± 0.186 ³⁾

表 6 小柴胡颗粒对硫代乙酰胺诱导大鼠急性肝损伤肝组织 Nrf2, Keap1,NQO1 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Effect of Xiaochaihu granule on protein expression of Nrf2, Keap1,NQO1 in liver tissues in rats with acute liver injury induced by thioacetamide($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	Nrf2	Keap1	NQO1
空白	—	7	1	1	1
模型	—	6	0.891 ± 0.052 ¹⁾	0.800 ± 0.117 ¹⁾	0.977 ± 0.053
小柴胡颗粒	1	6	1.039 ± 0.153 ²⁾	0.945 ± 0.157	1.425 ± 0.602
	2	6	1.052 ± 0.154 ²⁾	0.956 ± 0.139 ²⁾	1.875 ± 0.600 ³⁾
	4	5	0.853 ± 0.074	1.039 ± 0.090 ³⁾	1.671 ± 0.495 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$; ³⁾ $P < 0.01$ (表 7 同)。

表 7 小柴胡颗粒对硫代乙酰胺诱导大鼠急性肝损伤肝组织 HO-1, GCLC,GCLM 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Effect of Xiaochaihu granule on protein expression of HO-1, GCLC, and GCLM in liver tissues in rats with acute liver injury induced by thioacetamide($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	HO-1 /β-actin	GCLC /β-actin	GCLM /β-actin
空白	—	7	1	1	1
模型	—	6	1.191 ± 0.408	0.830 ± 0.060 ¹⁾	0.755 ± 0.235 ¹⁾
小柴胡颗粒	1	6	1.680 ± 0.574	0.992 ± 0.168 ²⁾	1.154 ± 0.155 ²⁾
	2	6	1.816 ± 0.495 ²⁾	1.125 ± 0.193 ³⁾	1.164 ± 0.304 ²⁾
	4	5	1.748 ± 0.144 ³⁾	1.176 ± 0.193 ³⁾	1.170 ± 0.305 ²⁾

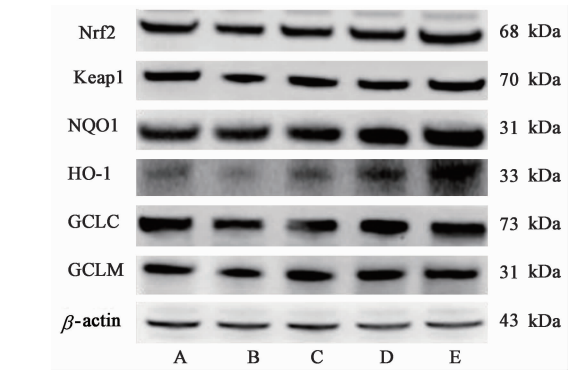


图 2 大鼠肝脏组织 Nrf2,Keap1,NQO1,HO-1,GCLC,GCLM 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of Nrf2, Keap1, NQO1, HO-1, GCLC and GCLM protein in rat liver

肝脏失去解毒功能,进而引发一系列的并发症如电解质代谢紊乱、黄疸等,严重者可导致死亡。因此,从根本上治疗急性肝损伤可有效减轻病情进一步恶化。小柴胡汤由北柴胡、法半夏、黄芩片、党参片、大枣、甘草片及生姜组成,是被正式认定用于治疗慢性肝病且应用最广的处方药^[18],小柴胡颗粒是在此基

础上制备的固体汤剂。本研究表明小柴胡颗粒各剂量组均可不同程度的改善肝功能,如血清中的 ALT,AST 的改变。HE 染色结果显示,小柴胡颗粒显著改善了肝损伤程度和炎症浸润的进展。说明小柴胡颗粒对 TAA 诱导的大鼠急性肝损伤具有治疗作用。

肝脏是代谢活跃的器官,且具有广泛的抗氧化系统。正常情况下,活性氧簇 ROS 产生于肝脏细胞中,作为正常代谢和解毒的副产物,产生的 ROS 通过肝脏中的抗氧化系统迅速消除。而急性肝损伤发生后,肝细胞受损导致其线粒体损伤从而 ROS 生成过多而形成损伤状态^[19]。近年发现,Nrf2 和胞浆蛋白伴侣 Keap1 是细胞抗氧化反应的中枢调节者,在细胞抵御内、外源性氧化应激机制中占据重要地位^[20-21],正常情况下,Nrf2 与 Keap1 结合而处于活性抑制状态。在某些药物或氧化应激源作用下,Nrf2 与 Keap1 解偶联后发生核转位,在核内与抗氧化反应元件(ARE)结合,启动 HO-1,NQO1,GCLM,GCLC mRNA 表达,增加谷胱甘肽过氧化物酶(GPX),NQO-1 及谷胱甘肽 S 转移酶(GST)的活

性^[22-23]。本研究中,观察到小柴胡颗粒治疗组显著降低肝组织 MDA 的含量,同时增加 T-SOD 的活性,说明小柴胡颗粒对急性肝损伤的治疗作用可能与抗氧化应激有关。进一步研究发现小柴胡颗粒显著激活 Nrf2 信号通路及其下游分子 NQO1, GCLC 和 GCLM 的 mRNA 及蛋白的表达。结合药效学结果推测肝细胞可能通过 Nrf2 途径对抗外源性物质引起氧化应激。

综上,本研究表明小柴胡颗粒通过改善肝功能和肝组织病理学变化对 TAA 诱导的大鼠急性肝损伤具有明确的治疗作用。基于本研究结果,小柴胡颗粒治疗急性肝损伤的作用机制可能是通过调节 Nrf2 途径对抗氧化应激,从而进一步修复肝细胞损伤。鉴于抗氧化应激在修复肝细胞中的重要作用,这些结果揭示了小柴胡颗粒对急性肝损伤的治疗前景。

[参考文献]

[1] 吕晓梅,马丽杰. 中药治疗急性肝损伤的研究进展[J]. 中国新药杂志,2016,25(2):170-174.

[2] 吴百灵. 丹参对 CCl₄ 所致急性肝损伤保护作用的研究[J]. 中华中医药学刊,2002,20(3):363-381.

[3] 杨婷婷,王伟,李国全,等. 水飞蓟宾对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(10):102-106.

[4] 刘钰华,叶少武,陈伟坚,等. 复方肝宁颗粒的制备及其对 CCl₄ 诱导小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(14):18-22.

[5] 刘佩莉,李楠,于云,等. 复方枳椇子对四氯化碳致大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):234-237.

[6] 沈洪,张蓓. 急性肝损伤研究进展[J]. 现代中西医结合杂志,2009,18(18):2211-2213.

[7] 冯艺萍. 天然药物抗急性肝损伤研究进展[J]. 现代医药卫生,2011,27(21):3282-3284.

[8] 王越,姚叶涛,杨亚洋,等. 硫代乙酰胺引起兔肝纤维化及肾毒性作用的研究[J]. 毒理学杂志,2018,32(5):403-407.

[9] 马一铭,张盈. 小柴胡汤内科临床应用[J]. 天津中医药大学学报,2016,35(3):207-210.

[10] 谢斌,余大军,严小军. 加味小柴胡汤对酒精所致急性肝损伤的保护作用[J]. 中国热带医学,2007,7(8):1298-1299.

[11] Nguyen T, Nioi P, Pickett C B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress [J]. J Biol Chem. 2009, 284 (20): 13291-13295.

[12] 李晋,徐尚福,李远洋,等. 小柴胡汤对肝纤维化大鼠肝脏 MMP-2、TIMP-2 表达的影响[J]. 辽宁中医杂志,2018,45(5):1066-1068,1119.

[13] 李晋,徐尚福,金凤,等. 小柴胡汤下调 JAK2, STAT3 的表达治疗大鼠肝纤维化[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(18):118-122.

[14] LI J, HU R, XU S, et al. Xiaochaihutang attenuates liver fibrosis by activation of Nrf2 pathway in rats [J]. Biomed Pharmacother,2017,96(1):847-853.

[15] SU G Y, YANG J Y, WANG F, et al. Xiaochaihutang prevents depressive-like behaviour in rodents by enhancing the serotonergic system [J]. J Pharm Pharmacol, 2014, 66(6):823-834.

[16] 魏新智,付勇强,王琿,等. 硫代乙酰胺建立大鼠急性肝损伤模型探讨[J]. 临床医学工程,2009,16(5):48-49.

[17] XU S F, JIN T, LU Y F, et al. Effect of icariin on UDP-glucuronosyltransferases in mouse liver [J]. Planta Med, 2014,80(5):387-392.

[18] 王淑娟,艾群. 小柴胡汤抑制肝纤维化及肝癌的作用机制[J]. 日本医学介绍,2004,25(1):42-44.

[19] 胡琴,刘维,邵宏. 药物性肝损伤的药物治疗研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学,2016,21(2):231-236.

[20] Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, et al. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2018, 1865(5):721-733.

[21] 胡勇,张爱华. PKC-Nrf2/Keap1-ARE 抗氧化通路与肝脏疾病 [J]. 癌变·畸变·突变,2012,24(2):151-153,156.

[22] Rohrer R R, Rudraiah S, Goedken M J, et al. Is nuclear factor erythroid 2-related factor 2 responsible for sex differences in susceptibility to acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice? [J]. Drug Metab Dispos,2014, 42(10):1663-1674.

[23] XU S F, JI L L, WU Q, et al. Ontogeny and aging of Nrf2 pathway genes in livers of rats [J]. Life Sci,2018, doi:10.1016/j.lfs.2018.04.018.

[责任编辑 孙丛丛]