

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

张茹^{1,2}, 曲中原¹, 杜娟¹ (1. 哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076; 2. 黑龙江省预防与治疗老年病药物研究重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要: **目的** 探讨五指毛桃(*Fici Hirtae Radix*, FHR)醇提取物对小鼠酒精性肝损伤的保护作用及其机制。**方法** 将 60 只小鼠随机分为对照组、模型组、阳性对照组及五指毛桃醇提取物高、中、低剂量组。除对照组给予生理盐水灌胃外, 其余各组小鼠以梯度酒精灌胃法复制酒精性肝损伤模型。复制模型同时, 阳性对照组灌胃给予 50 mg·kg⁻¹ 水飞蓟素, 五指毛桃醇提取物组分别灌胃给予 2、1、0.5 g·kg⁻¹ 五指毛桃醇提取物进行干预, 对照组、模型组灌胃给予等体积生理盐水, 连续 6 周。复制模型成功后取材, HE 染色法观察肝组织病理变化; 比色法测定血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)水平, 肝组织内丙二醛(MDA)和还原型谷胱甘肽(GSH)含量, 超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性; 并采用蛋白质印迹法测定核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)、血红素加氧酶 1(HO-1)、超氧化物歧化酶 1(SOD-1)和细胞色素 P450 2E1(CYP 2E1)的蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较, 模型组小鼠肝细胞肿胀, 排列散乱, 中央静脉周围小变性明显, 呈现肝细胞灶状坏死; 血清中 ALT 和 AST 水平明显升高($P < 0.01$); 肝组织中 MDA 含量明显升高($P < 0.01$), SOD 活性明显降低($P < 0.01$), GSH 含量和 GSH-Px 活性明显降低($P < 0.01$); Nrf2、HO-1 及 SOD-1 蛋白水平明显降低($P < 0.05$), CYP2E1 蛋白水平明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较, 五指毛桃醇提取物各剂量组肝脏炎性细胞浸润减少, 肝脏组织坏死减轻; 五指毛桃醇提取物高、中剂量组明显降低 ALT、AST 水平($P < 0.05$); 五指毛桃醇提取物高、中剂量组明显降低 MDA 水平($P < 0.05$), 五指毛桃醇提取物低剂量组明显升高 GSH 含量($P < 0.05$), 五指毛桃醇提取物各剂量组均明显升高 SOD 水平($P < 0.05$), 五指毛桃醇提取物高、低剂量组明显升高 GSH-Px 活性($P < 0.05$); 五指毛桃醇提取物高剂量组明显上调 Nrf2 蛋白表达水平($P < 0.05$), 五指毛桃醇提取物高、低剂量组明显上调 HO-1 蛋白表达水平($P < 0.05$), 五指毛桃醇提取物高、中剂量组明显上调 SOD-1 蛋白表达水平($P < 0.05$), 五指毛桃醇提取物中、低剂量组明显下调 CYP2E1 蛋白表达水平($P < 0.05$)。**结论** 五指毛桃醇提取物对酒精性肝损伤小鼠具有保护作用, 其机制可能是通过激活 Nrf2, 诱导调控下游抗氧化因子或抗氧化系统, 并抑制 CYP2E1 异常活化, 减轻氧化应激反应, 从而降低酒精对肝脏的损伤。

关键词: 五指毛桃; 醇提取物; 酒精性肝损伤; 氧化应激; Nrf2-HO-1/CYP2E1 通路; 小鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)12-1769-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.12.006

Antioxidant Protective Mechanism of Alcohol Extract of *Fici Hirtae Radix* on Mice with Alcoholic Liver Injury Through Nrf2-HO-1/CYP2E1 Pathway

ZHANG Ru^{1,2}, QU Zhongyuan¹, DU Juan¹ (1. College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076 Heilongjiang, China; 2. Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Drug Prevention and Treatment for Senile Diseases, Harbin 150076 Heilongjiang, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect and mechanism of alcohol extract of *Fici Hirtae Radix* (FHR) on alcoholic liver injury in mice. **Methods** Sixty mice were randomly divided into control group, model

收稿日期: 2021-04-26

作者简介: 张茹, 女, 讲师, 博士, 硕士研究生导师, 研究方向: 中药活性成分和作用机制。Email: yiyi104@163.com。

基金项目: 黑龙江省博士后资助项目(LBH-Z13128); 哈尔滨商业大学青年创新人才培养计划项目(17XN034)。

group, positive control group and FHR high-, medium- and low- dose groups. The control group was given normal saline by gavage, while the mice in other groups were given gradient alcohol by gavage to replicate the alcoholic liver injury model. And then, the positive control group was given $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ silymarin by gavage, the drug group was given $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ FHR by gavage, the control group and the model group were treated with equal volume of normal saline by gavage for 6 weeks, respectively. After the model was successfully made, the pathological changes of liver tissue were observed by HE staining, and the levels of ALT, AST, MDA, GSH, SOD, GSH-Px in liver tissue were measured. The protein expression levels of Nrf2, HO-1, SOD-1 and CYP2E1 in liver tissue were detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the hepatocytes in the model group were swollen and scattered, the small degeneration around the central vein was significant. It was found that focal necrosis of hepatocytes, the levels of ALT and AST increased significantly ($P < 0.01$), the level of MDA in liver tissue increased significantly ($P < 0.01$), the activity of SOD decreased significantly ($P < 0.01$), the content of GSH and activity of GSH-Px decreased significantly ($P < 0.05$), the protein expression levels of Nrf2, HO-1 and SOD-1 decreased significantly ($P < 0.05$), and the protein level of CYP2E1 increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, the infiltration of inflammatory cells and necrosis of liver tissue were reduced in FHR groups, the levels of ALT and AST in FHR high-, medium- dose groups were decreased ($P < 0.05$), while the level of MDA was decreased obviously ($P < 0.05$). The content of GSH in FHR low-dose group was significantly increased ($P < 0.05$), the activities of SOD in FHR groups and GSH-Px in high-, low- dose groups were increased ($P < 0.05$). High-dose FHR obviously upregulated the expression of Nrf-2 ($P < 0.05$), high- and low- dose FHR obviously upregulated the expression of HO-1 ($P < 0.05$). In addition, high- and medium- dose FHR apparently upregulated the expression of SOD-1 ($P < 0.05$), medium- and low- dose FHR markedly downregulated the expression of CYP2E1 ($P < 0.05$). **Conclusion** FHR has protective effect on mice with alcoholic liver injury, and its mechanism may be involved in activating Nrf2, inducing and regulating downstream antioxidant factors or antioxidant system, inhibiting abnormal activation of CYP2E1, alleviating oxidative stress response, so as to reduce alcoholic liver injury.

Keywords: *Fici Hirtae Radix*; alcohol extract; alcoholic liver injury; oxidative stress; Nrf2- HO-1/CYP2E1 pathway; mice

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是临床常见的一种肝损伤形式, 由于长期或大量饮酒, 乙醇在体内代谢过程中产生有害物质从而引发肝脏病变^[1]。研究^[2]表明, 氧化应激贯穿酒精性肝病的始终, 是引起酒精性肝脏病变的重要机制之一。降低氧化应激水平, 减少肝损伤, 对于酒精性肝病的防治具有重要意义^[3]。中医认为酒为水谷之精气, 其气剽悍而有火毒, 为湿热之品, 饮酒过度是外因, 造成内伤饮食劳役和脾胃受损是发病关键^[4]。因此, 解酒毒、健脾、清热利湿, 以治病求本, 从脾论治为酒精性肝病的中医治疗原则。

五指毛桃(*Fici Hirtae Radix*, FHR)为桑科榕属植物粗叶榕 *Ficus hirta* Vahl 的干燥根^[5], 具有健脾补肺、行气利湿、舒筋活络功效。由于益气补虚功同黄芪, 却药性温和, 补而不峻, 为岭南地区常用药

材及补益食材, 有“南芪”之称^[6]。近年来研究^[7-9]发现, 五指毛桃中含有苯丙素类、黄酮类、萜类、甾醇类及挥发油类等多种类型的化合物。五指毛桃化合物具有良好的抗炎、抗氧化活性以及调节免疫、保肝、抗突变等作用^[10]。相关药理研究^[11-13]表明, 五指毛桃对药物、拘束应激性肝损伤具有明显保护作用。本研究将考察五指毛桃醇提取物对酒精性肝损伤的保护作用, 并从抗氧化应激角度探讨其保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物 ICR 小鼠, 雄性, SPF 级, 5 周龄, 体重 $18 \sim 20 \text{ g}$, 长春市亿斯实验动物有限公司提供, 动物许可证号: SCXK(吉)2020-0002, 动物质量合格证号: 202100036796。动物饲养于干净舒适的环境。

境, 温度(22±2)℃, 湿度(60±5)%。动物实验过程符合相关伦理要求, 已通过哈尔滨商业大学伦理委员会审核, 伦理审批号: 2020090201。

1.2 药物及试剂 五指毛桃购自广东省佛山市, 经哈尔滨商业大学药学院张翠教授鉴定为桑科榕属植物粗叶榕 *Ficus hirta* Vahl 的干燥根。56°牛栏山二锅头, 购自北京顺鑫农业股份有限公司牛栏山酒厂, 批号为: 20190512; 水飞蓟素, 购自天津天士力制药股份有限公司, 批号为: 20181121; 甲醛, 购自天津永晟精细化工有限公司, 批号为: 20181112; 谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测定试剂盒, 购自南京建成生物工程研究所, 批号分别为: 20190723、20190720、20190723、20190724、20190718、20190723; 核因子-E2 相关因子 2(Nrf2)抗体、HO-1 血红素加氧酶-1(HO-1)抗体、超氧化物歧化酶 1(SOD-1)抗体、 β -actin 抗体、HRP 标记山羊抗兔 IgG, 购自沈阳万类生物科技公司, 批号分别为: L09032135、L02212400、L03121533、L08121372、23A090; ECL 显色液, 购自北京普利莱基因技术有限公司, 批号为: 202010AP1010; 细胞色素 P450 2E1(CYP2E1)一抗、RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂(PMSF)、BCA 蛋白测定试剂盒, 购自上海碧云天生物技术有限公司, 批号分别为: 061220201210、080320200921、033020200909、120219200819。

1.3 仪器 DZKW-D-2 电热恒温水浴锅, 北京市永光明医疗仪器厂; F6/10 实验室超细匀浆机, 上海弗鲁克科技发展有限公司; 722 型紫外-可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; Infinite F50 全波长酶标仪, 德国 Tecan 公司; BX60 型光学显微镜, 日本 OLYMPUS 公司; H1650R 低温离心机, 湖南湘仪离心机仪器有限公司; Mini-PROTEAN 电泳系统, 美国 BIO-RAD 公司; Azure C300 化学发光成像系统, 美国 Azure Biosystems 公司。

1.4 药物制备 五指毛桃粉碎, 称质量, 加入 10 倍 75%乙醇浸泡 45 min, 超声提取 0.5 h, 共 2 次, 过滤, 回收乙醇。将浸膏用蒸馏水配制为每毫升含 4 g 生药的溶液, 置于 4℃冰箱冷藏备用。使用前按照各组给药剂量用蒸馏水进行稀释。

1.5 分组、模型复制及给药 适应性喂养 1 周后, 将 60 只小鼠随机分为 6 组, 即对照组、模型组、阳性对照(水飞蓟素 50 mg·kg⁻¹)组及五指毛桃醇提取物

高、中、低剂量组, 每组 10 只。根据相关研究^[14]以及本课题组前期工作, 以梯度乙醇灌胃法建立酒精性肝损伤模型: 除对照组灌胃给予等体积生理盐水外, 其余各种小鼠于每日上午按 5 mL·kg⁻¹灌胃给予 56°白酒, 每 2 d 增量 5 mL·kg⁻¹, 直至 10 mL·kg⁻¹不再增加。每日下午, 阳性对照组小鼠灌胃给予 50 mg·kg⁻¹水飞蓟素, 五指毛桃醇提取物高、中、低剂量组分别灌胃给予 2、1、0.5 g·kg⁻¹五指毛桃醇提取物进行干预, 对照组、模型组灌胃给予等体积生理盐水, 共 6 周。各组灌胃体积均按体质量 10 mL·kg⁻¹。

1.6 取样 末次给药结束后, 所有小鼠禁食不禁水 12 h, 给予 3%戊巴比妥钠进行腹腔注射麻醉, 眼眶静脉丛取血, 采集血液, 置于 EP 管内, 室温静置一段时间后, 以 600×g 离心 10 min。取上清液, 分装于 EP 管内, 于-80℃冰箱中保存。取血结束后, 于冰上快速摘取肝脏组织, 称质量后取部分组织固定于 10%福尔马林溶液(40%甲醛与蒸馏水之比为 1:9 配制)中, 其余组织于-80℃冰箱中冻存。

1.7 血清中转氨酶测定 按照试剂盒说明书操作, 采用全波长酶标仪测定各组小鼠血清中的 ALT 和 AST 水平。

1.8 肝脏组织病理学观察 取组织固定液中固定 24 h 的肝组织叶片, 脱水并进行石蜡包埋。包埋好的蜡块切成约 4 μm 厚度附于载玻片。以 HE 试剂对组织进行染色, 中性树胶封片, 显微镜下观察肝脏组织的病理变化。

1.9 肝脏组织氧化损伤指标测定 将冻存的肝组织制成 10%的组织匀浆液, 采用生化法分别测定肝匀浆组织中 MDA、GSH 含量、GSH-Px 及 SOD 活性, 按照试剂盒说明书操作。

1.10 Western Blot 法检测肝组织中 Nrf2、HO-1、SOD-1 和 CYP2E1 蛋白表达水平 取 20 mg 小鼠肝组织, 加入 0.2 mL RIPA 裂解液, 于冰上充分研磨, 磨碎后放置 5 min 使其充分裂解。将匀浆液转移至预冷的 1.5 mL EP 管中, 以 12 000×g、4℃离心 10 min。吸取上清至另一 EP 管中, 取少量上清, 按 BCA 蛋白测定试剂盒说明书测定肝组织中蛋白浓度, 进行蛋白定量。根据所测定的蛋白浓度, 将所有样品统一到相同浓度, 并加入 1/4 体积左右的 SDS-PAGE 电泳上样缓冲液, 然后放在 100℃沸水浴中煮 5 min, 使蛋白变性, 方可作为蛋白样品。将制备好的蛋白样品进行分装, 即刻进行电泳分析或冻存于-20℃。

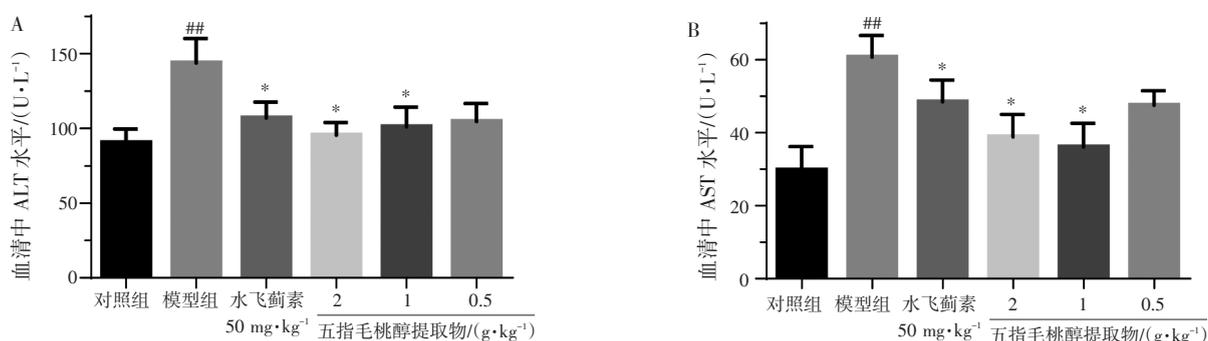
电泳条件为 80 V 30 min, 120 V 1.5~2 h; 电泳完成后于转膜槽中转膜, 200 mA 45 min~1 h; 取出 NC 膜于 5% 的脱脂奶粉中室温封闭 2 h, TBST 冲洗。 β -actin、Nrf2、HO-1 一抗(1:500), SOD-1 和肝细胞色素 P450 2E1 一抗(1:1 000)于 4 ℃ 孵育过夜, 所有抗体用抗体稀释液稀释。次日取出、洗膜后于水平摇床上二抗(1:6 000)孵育 1 h, 洗膜, ECL 显色。采用 ImageJ 软件计算各条带灰度值。

1.11 统计学处理方法 采用 SPSS 19.0 软件对所得数据进行统计分析, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间数值比较采用单因素方差分析方法, 若方

差不齐性则采用 LSD-*t* 法进行两两比较, 若方差不齐则采用 Dunnett's T3 法进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 五指毛桃醇提取物对酒精性肝损伤小鼠血清转氨酶的影响 结果如图 1 所示。与对照组比较, 模型组 ALT、AST 水平明显升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 阳性对照(水飞蓟素 50 mg·kg⁻¹)组和五指毛桃醇提取物高、中(2、1 g·kg⁻¹)剂量组 ALT、AST 水平明显降低($P < 0.05$)。



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$

图 1 五指毛桃醇提取物对酒精性肝损伤小鼠血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Figure 1 Effect of alcohol extract of FHR on ALT and AST levels in serum of mice with alcoholic liver injury($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

2.2 五指毛桃醇提取物对酒精性肝损伤小鼠肝脏组织病理学的影响 结果见图 2。肝脏组织切片 HE 染色显示, 对照组小鼠肝细胞形态正常, 排列整齐, 无炎性细胞浸润, 以中央静脉为中心周围肝细胞索呈放射状排列。模型组小鼠肝脏出现肝细胞坏死, 显微镜下肝细胞排列散乱, 呈现肝细胞灶状坏死, 出现炎性细胞浸润, 肝细胞索消失。与模型组比较, 五指毛桃醇提取物各剂量组和阳性对照组小鼠肝脏组织坏死不同程度减轻, 炎性细胞浸润减少。

2.3 五指毛桃醇提取物对酒精性肝损伤小鼠肝脏氧化损伤指标的影响 结果见图 3。与对照组比较, 模型

组小鼠肝脏组织内 MDA 含量明显升高($P < 0.01$), SOD 活性、GSH 含量和 GSH-Px 活性均明显降低($P < 0.01$)。与模型组比较, 阳性对照(水飞蓟素 50 mg·kg⁻¹)组和五指毛桃醇提取物高、中(2、1 g·kg⁻¹)剂量组 MDA 含量均明显降低($P < 0.05$), 阳性对照组和五指毛桃醇提取物低(0.5 g·kg⁻¹)剂量组 GSH 含量均明显升高($P < 0.05$), 阳性对照组和五指毛桃醇提取物各剂量组 SOD 活性均明显升高($P < 0.05$), 阳性对照组和五指毛桃醇提取物高、低(2、1 g·kg⁻¹)剂量组 GSH-Px 活性均明显升高($P < 0.01$, $P < 0.05$)。以上结果提示, 酒精性肝损伤模型小鼠肝脏组织内

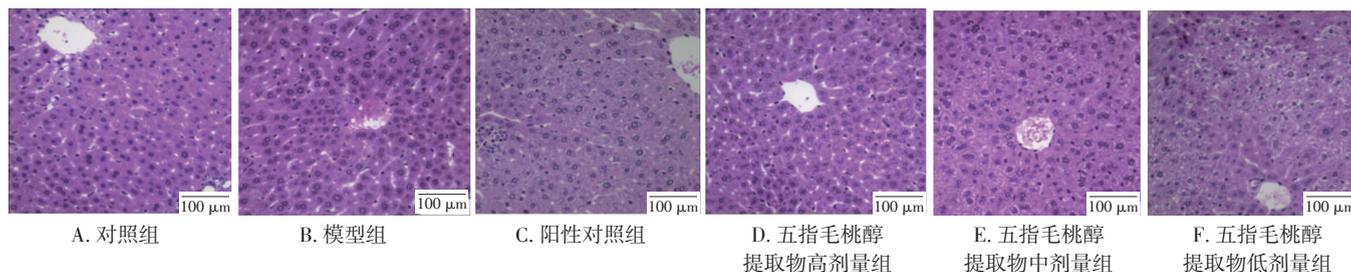
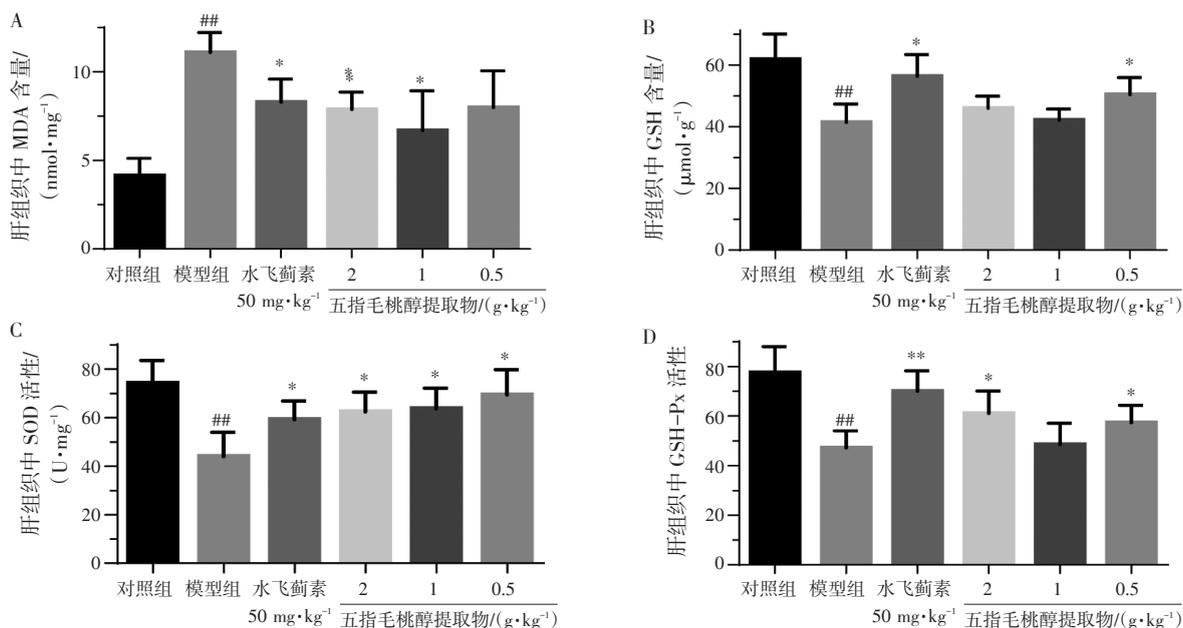


图 2 五指毛桃醇提取物对酒精性肝损伤小鼠肝脏组织病理学的影响(HE 染色, $\times 200$)

Figure 2 Effect of alcohol extract of FHR on liver histopathology in mice with alcoholic liver injury(HE, $\times 200$)



注：与对照组比较，**P* < 0.05，***P* < 0.01；与模型组比较，**P* < 0.05，***P* < 0.01

图 3 五指毛桃醇提取物对酒精性肝损伤小鼠肝脏组织 MDA、GSH、SOD 和 GSH-Px 的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Figure 3 Effects of alcohol extract FHR on MDA, GSH, SOD and GSH-Px in liver tissue of mice with alcoholic liver injury($\bar{x} \pm s, n=10$)

过氧化反应产物增多，抗氧化酶活性降低，五指毛桃醇提取物能够明显提高抗氧化酶活性，改善酒精所致小鼠肝脏氧化损伤。

2.4 五指毛桃醇提取物对酒精性肝损伤小鼠氧化应激相关蛋白表达水平的影响 如图 4 所示，与对照组比较，模型组小鼠肝脏组织 Nrf-2、HO-1、SOD-1 蛋白表达水平均明显降低(*P* < 0.05)，提示酒精能够损伤肝脏抗氧化防御系统；与模型组比较，阳性对照(水飞蓟素 50 mg·kg⁻¹)组和五指毛桃醇提取物高(2 g·kg⁻¹)剂量组明显升高 Nrf-2 蛋白表达水平(*P* < 0.05)，阳性对照组和五指毛桃醇提取物高、低(2、0.5 g·kg⁻¹)剂量组明显升高 HO-1 蛋白表达水平(*P* < 0.05)，阳性对照组和五指毛桃醇提取物高、中(2、1 g·kg⁻¹)剂量组明显升高 SOD-1 蛋白表达水平(*P* < 0.05)。与对照组比较，模型组 CYP2E1 蛋白表达水平明显升高(*P* < 0.05)，提示酒精可以使 CYP2E1 异常活化，五指毛桃醇提取物中、低(1、0.5 g·kg⁻¹)剂量组干预后，CYP 2E1 蛋白表达水平明显降低(*P* < 0.05)。

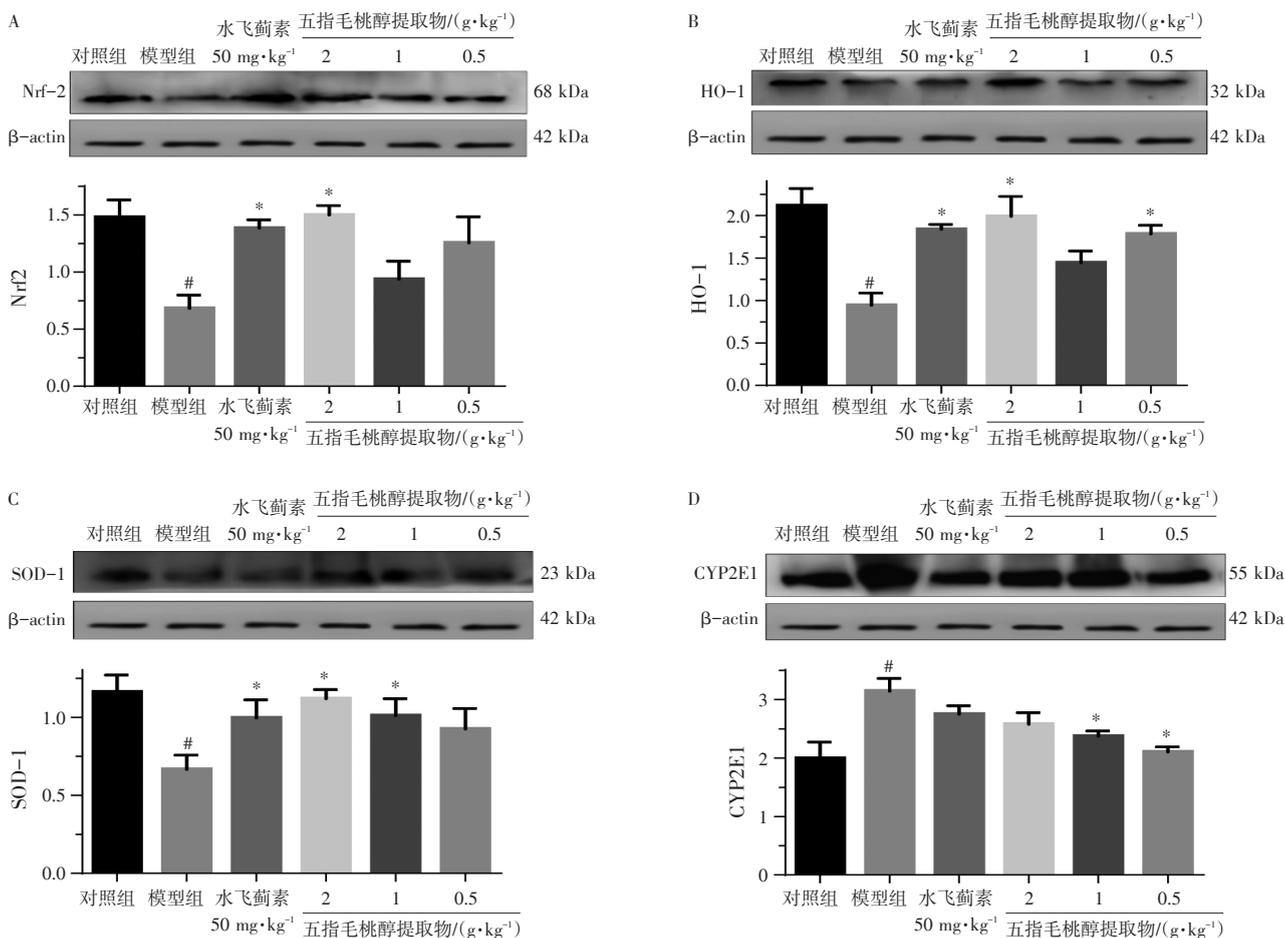
3 讨论

随着我国经济发展和生活水平不断提高，人们的生活方式及饮食结构发生了很大变化，由饮酒导致的酒精性肝病(ALD)在我国有逐年上升的趋势，已成为除病毒性肝炎所致肝损伤以外的第二大常见肝

病，严重威胁人们的健康^[15]。

我国古代医学很早就对饮酒伤肝有了一定的认识，如文献记载有“胁痛”“酒疸”“伤酒”“酒癖”“酒臌”等证候名^[16]。中医学认为，酒为水谷之精，乃大热之品。《本草纲目》^[17]记载：“酒…苦、甘、辛、大热、有毒……少饮则和血行气，多饮则杀人顷刻”。过量饮酒可导致脏腑功能失调，其基本病因病机为，在禀赋不足、脾胃虚弱的基础上，感受湿热酒毒而成，气、血、痰、湿、热等相互搏结，最终形成本虚标实的特点^[18]。因此从脾论治，解酒毒、健脾、清热利湿等是中医药防治酒精性肝损伤的法则。五指毛桃是岭南地区常用药材和补益食材，入脾、肺、胃、大肠、肝经，具有健脾补肺、行气利湿、舒筋活络等功效，其益气补虚功同黄芪，且药性温和，补而不峻^[6]。五指毛桃扶正不碍邪、助脾健运、行气利湿的特点紧扣酒精性肝损伤的病因病机。现代药理研究^[12-14]亦表明，五指毛桃对化学性以及拘束应激性肝损伤均具有明显的保护作用。基于此，我们认为，五指毛桃对过量饮酒所致肝损害具有潜在的保护作用。本研究通过建立酒精性肝损伤动物模型，以五指毛桃醇提取物进行干预，并初步探讨了其对肝的保护作用以及作用机制。

现代医学研究认为，酒精性肝病的发病机制复杂多样，多种因素的相互作用导致酒精性肝病的发生和发展，其中氧化应激机制被认为是酒精性肝病的



注：与对照组比较，[#]*P* < 0.05；与模型组比较，^{*}*P* < 0.05

图4 五指毛桃醇提取物对酒精性肝损伤小鼠 Nrf-2(A)、HO-1(B)、SOD-1(C)、CYP2E1(D)蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)
 Figure 4 Effect of alcohol extract FHR on Nrf-2(A), HO-1(B), SOD-1(C) and CYP2E1(D) protein expression in mice with alcoholic liver injury($\bar{x} \pm s, n=10$)

主要发病机制，在酒精性肝病的发生、发展中发挥重要作用^[2-3]。酒精在机体内代谢过程中会产生大量活性氧和活性氮自由基，当其超过机体清除能力时，便会引起肝脏的氧化应激损伤，进一步导致酒精性脂肪肝、肝炎、肝硬化，甚至肝癌^[19]。本研究结果显示，酒精可损害小鼠肝脏组织形态及功能，肝脏出现肝细胞坏死、炎性细胞浸润；反映肝功能的血清 ALT、AST 水平明显升高，说明肝细胞受损；肝脏内过氧化产物 MDA 增多，内源性抗氧化物质 SOD、GSH 活性、GSH-Px 水平降低，提示酒精使肝脏清除自由基能力下降，氧化和抗氧化平衡被打破，产生氧化应激反应。五指毛桃醇提取物能够对抗酒精导致的上述肝损害反应，使肝脏组织坏死不同程度地减轻，炎性细胞浸润减少，降低 ALT、AST 水平，是通过升高 SOD、GSH 活性、GSH-Px 水平，减少 MDA 产生，减弱肝脏内氧化应激反应发挥保护作用的。

细胞色素 P450 2E1(CYP2E1)与酒精代谢密切相关^[20]。酒精对 CYP2E1 有较强的诱导作用，活化产生大量 ROS，进而诱导氧化应激介导的肝线粒体损伤^[21]。敲除 CYP2E1 基因可有效抑制酒精所致的脂肪肝、酒精性肝炎和肝纤维化。本研究显示，模型组小鼠 CYP2E1 蛋白表达水平明显升高，五指毛桃醇提取物能够明显降低 CYP2E1 蛋白表达水平，提示五指毛桃醇提取物可以通过抑制酒精介导的 CYP2E1 异常活化而减少肝脏损伤。

核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2)作为一种转录因子，可通过增强一系列细胞保护基因的转录来减轻氧化应激。当机体代谢酒精时，Nrf2 介导的信号通路是抗氧化的关键信号通路^[22]。在正常情况下，Nrf2 与胞质 Keap1 (Kelch-like epichlorohydrin-associated protein 1, Keap1) 结合，并以非活性状态存在于细胞质中^[23]。在氧化应激发生时，Nrf2 从 Keap1 释放，易位到细胞核，并

通过与靶基因启动子区域的抗氧化反应元件 (antioxidant response elements, ARE) 结合诱导其靶基因, 从而激活 ARE 介导的抗氧化基因 (GCLC、GCLM 和 GST) 和 II 期解毒酶 (NQO-1, HO-1) 以对抗氧化应激^[24]。因此, Nrf2 信号通路可作为一个新的靶点, 通过激活该通路减轻酒精性肝病的发生、发展。本研究结果显示, 五指毛桃醇提取物可以增加 Nrf2、HO-1、SOD1 蛋白表达水平, 提示五指毛桃醇提取物可能通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路, 上调下游抗氧化酶 SOD、GSH-Px 的活性, 使抗氧化系统恢复平衡状态, 从而保护肝脏避免酒精导致的过氧化损伤。

目前, 已从五指毛桃中分离鉴定出 180 多个化合物, 包括黄酮、苯丙素类、萜类、甾醇类、醛类、酚类、酯类和挥发油等多种成分^[25]。五指毛桃化合物具有多种药理活性, 其中抗炎、抗氧化、抗纤维化、调节免疫等作用可能在减轻酒精性肝损伤中亦发挥保护作用。本研究结果表明, 五指毛桃醇提取物可以通过激活抗氧化关键信号通路 Nrf2/HO-1 相关分子表达, 上调其下游抗氧化物质 SOD、GSH-Px、GSH 水平, 以及降低 CYP2E1 蛋白表达等途径, 维持了机体抗氧化系统平衡, 从而保护酒精性肝损伤模型动物肝脏形态和功能。本研究有助于更好地理解五指毛桃保护肝脏的抗氧化作用机制, 为五指毛桃的进一步研究、开发和应用提供了实验依据。

参考文献:

- [1] 葛均波, 徐永健, 王辰. 内科学[M]. 9版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 392-394.
- [2] 邱萍, 李相, 孔德松, 等. 酒精性肝病发病机制研究的新进展[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(2): 160-162.
- [3] 夏婷, 张瑾, 姚佳慧, 等. 氧化应激在酒精性肝病中作用机制的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(10): 1353-1356.
- [4] 巢元方. 诸病源候论[M]. 丁光迪, 校注. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 500.
- [5] 马雅静, 刘焕, 史晶晶, 等. 五指毛桃的质量标准研究[J]. 中草药, 2017, 48(4): 782-791.
- [6] 马骥, 张宏伟. 岭南本草[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 66.
- [7] YE X S, TIAN W J, WANG G H, et al. Phenolic glycosides from the roots of *Ficus hirta* Vahl. and their antineuro inflammatory activities[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2020, 68(14): 4196-4204.
- [8] TRAN D D, NGUYEN T T, DAO D T, et al. A new furanocoumarin glycoside from the roots of *Ficus hirta*[J]. Letters in Organic Chemistry, 2018, 15(12): 1007-1011.
- [9] JUN C, XIAO M Y, WANG Y H, et al. Phenolics from the roots of hairy fig (*Ficus hirta* Vahl.) exert prominent anti-inflammatory activity [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 31(1): 79-88.
- [10] 叶童, 石瑞娟, 吴易武, 等. 五指毛桃的化学成分和药理活性研究进展[J]. 广东药科大学学报, 2019, 35(4): 591-596.
- [11] 吕颖坚, 贾凤兰, 阮明, 等. 五指毛桃水提物对二甲基甲酰胺所致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中药材, 2008, 31(9): 1364-1368.
- [12] 王敏, 何蓉蓉, 李怡芳, 等. 五指毛桃水提物对拘束应激性肝损伤的保护作用[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(6): 522-525.
- [13] 蔡青园, 陈虎彪, 赵中振, 等. 五指毛桃拮抗毒品可卡因的肝毒性作用及其活性成分研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(12): 1190-1193.
- [14] 胡昊, 李宁, 宋圆圆, 等. 两种酒精灌胃方案诱导大鼠酒精性肝损伤模型比较研究[J]. 医学理论与实践, 2020, 33(15): 2420-2422.
- [15] WANG F S, FAN J G, ZHANG Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. Hepatology, 2014, 60(6): 2099-2108.
- [16] 叶永安, 田德录. 酒精性肝病中医认识初探[J]. 中国医药学报, 1997, 12(5): 9-10.
- [17] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 1558, 1560, 1567.
- [18] 赵瑜, 唐义爽, 毛羽丰, 等. 脾虚血瘀——酒精性肝损伤的基本病机[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(9): 1488-1491.
- [19] NEUMAN M G, MALNICK S, MAOR Y, et al. Alcoholic liver disease: clinical and translational research[J]. Exp Mol Pathol, 2015, 99(3): 596-610.
- [20] LEUNG T M, NIETO N. CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2013, 58(2): 395-398.
- [21] CHACKO B, BALLINGER S W. Convergent mechanisms for dysregulation of mitochondrial quality control in metabolic disease: implications for mitochondrial therapeutics[J]. Biochem Soc Trans, 2013, 41(1): 127-133.
- [22] JADEJA R N, UPADHYAY K K, DEVKAR R V, et al. Naturally occurring Nrf2 activators: potential in treatment of liver disease[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 12(1): 1-13.
- [23] LOBODA A, DAMULEWICZ M, PYZA E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism[J]. Cellular and molecular life sciences: CMLS, 2016, 73(17): 3221-3247.
- [24] WANG Z, DOU X, LI S, et al. Nrf2 activation-induced hepatic VLDL overexpression in response to oxidative stress contributes to alcoholic liver disease in mice[J]. Hepatology, 2014, 59: 1381-1392.
- [25] WAN C P, CHEN C Y, LI M X, et al. Chemical constituents and antifungal activity of *Ficus hirta* Vahl. Fruits[J]. Plants, 2017, 6(4): 44-53.

(编辑: 修春)