

橙皮油素改善急性敌草快中毒小鼠肝脏损伤的作用机制

欧仁阳¹ 黄山² 马礼鸿¹ 赵志杰¹ 刘胜珊¹ 王元亮¹
孙叶子¹ 徐娜娜³ 周丽君³ 李美⁴ 周满红¹ 饶国胜¹

¹ 贵州茅台医院急诊科, 贵州仁怀 564500; ² 习水县人民医院重症医学科, 贵州习水 564600;

³ 遵义医科大学附属医院护理部, 贵州遵义 563000; ⁴ 仁怀市人民医院高压氧治疗中心, 贵州仁怀 564500

通信作者: 饶国胜, Email: 962235390@qq.com

【摘要】 目的 探讨橙皮油素(AUR)对急性敌草快(DQ)中毒致小鼠肝脏损伤是否有保护作用及其机制。**方法** 将40只SPF级健康雄性C57BL/6小鼠随机分为正常对照组(Control组)、DQ中毒模型组(DQ组)、AUR药物治疗组(DQ+AUR组)和AUR药物对照组(AUR组),每组10只。采用一次性腹腔注射40 mg/kg DQ纯水溶液0.5 mL的方法建立DQ中毒模型;Control组和AUR组腹腔注射等量纯水。制模成功4 h后,DQ+AUR组和AUR组灌胃0.5 mg/kg AUR纯水溶液0.2 mL;Control组和DQ组灌胃等量纯水;均每日1次,连续7 d。7 d后麻醉动物取血,处死后收集肝脏组织和血液样本。透射电镜下观察肝脏组织结构改变;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)水平;分别采用水溶性四氮唑-1(WST-1)法、硫代巴比妥酸(TBA)法及酶促反应法检测肝脏组织还原型谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)水平;采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测肝脏组织核因子E2相关因子2(Nrf2)、Kelch样ECH相关蛋白1(Keap1)、活化天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶9(caspase-9)、血红素加氧酶-1(HO-1)的蛋白表达。**结果** 透射电镜下显示,Control组线粒体轻度肿胀,基质分布不均,嵴结构少量断裂;AUR组线粒体轻度肿胀,嵴结构未见明显断裂;DQ组线粒体显著肿胀、体积增大,基质溶解,嵴结构断裂缺失,且大面积空泡化;DQ+AUR组线粒体肿胀、体积增大、基质溶解、嵴结构断裂缺失及空泡化较DQ组明显减轻。与DQ组比较,DQ+AUR组小鼠血清AST和ALT水平及肝脏组织MDA水平均显著降低[AST(U/L):173.45±23.60比255.33±41.51,ALT(U/L):51.77±21.63比100.70±32.35,MDA(μmol/g):12.40±2.76比19.74±4.10],肝脏组织GSH和SOD水平均显著升高[GSH(μmol/g):37.65±14.95比20.58±8.52,SOD(kU/g):124.10±33.77比82.81±22.00],差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。Western blotting检测结果显示,与DQ组比较,DQ+AUR组肝脏组织Nrf2和HO-1的蛋白表达均显著升高(Nrf2/β-actin:0.87±0.37比0.53±0.22,HO-1/β-actin:1.06±0.22比0.49±0.08),Keap1和活化caspase-9蛋白表达均显著降低(Keap1/β-actin:0.82±0.12比1.52±0.76,活化caspase-9/β-actin:1.16±0.28比1.71±0.30),差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。**结论** AUR可通过激活Keap1/Nrf2信号通路减轻DQ中毒所致小鼠急性肝脏损伤。

【关键词】 橙皮油素; 敌草快; 急性中毒; 急性肝脏损伤; 氧化应激

基金项目: 国家自然科学基金(82060346)

DOI: 10.3760/cma.jcn121430-20250113-00043

Mechanism of auraptene in improving acute liver injury induced by diquat poisoning in mice

Ou Renyang¹, Huang Shan², Ma Lihong¹, Zhao Zhijie¹, Liu Shengshan¹, Wang Yuanliang¹, Sun Yezi¹, Xu Nana³, Zhou Lijun³, Li Mei⁴, Zhou Manhong¹, Rao Guosheng¹

¹Department of Emergency, Kweichow Moutai Hospital, Renhuai, Renhuai 564500, Guizhou, China; ²Department of Intensive Care Medicine, Xishui County People's Hospital, Xishui 564600, Guizhou, China; ³Department of Nursing, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou, China; ⁴Hyperbaric Oxygen Treatment Center, Renhuai People's Hospital, Renhuai 564500, Guizhou, China

Corresponding author: Rao Guosheng, Email: 962235390@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate whether auraptene (AUR) exerts a protective effect on acute diquat (DQ)-induced liver injury in mice and explore its underlying mechanisms. **Methods** Forty SPF-grade healthy male C57BL/6 mice were randomly divided into normal control group (Control group), DQ poisoning model group (DQ group), AUR treatment group (DQ+AUR group), and AUR control group (AUR group), with 10 mice in each group. The DQ poisoning model was established via a single intraperitoneal injection of 40 mg/kg DQ aqueous solution (0.5 mL); Control group and AUR group received an equal volume of pure water intraperitoneally. Four hours post-modeling, DQ+AUR group and AUR group were administered 0.5 mg/kg AUR aqueous solution (0.2 mL) by gavage once daily for 7 consecutive days, while Control group and DQ group received pure water. Blood and liver tissues were collected after anesthesia on day 7. Liver ultrastructure was observed by transmission electron microscopy. Serum alanine aminotransferase (ALT)

and aspartate aminotransferase (AST) levels were measured via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Hepatic glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) levels were detected using WST-1, thiobarbituric acid (TBA), and enzymatic reaction methods, respectively. Protein expression of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), and activated caspase-9 in liver tissues was analyzed by Western blotting. **Results** Transmission electron microscopy revealed that mitochondria in the Control group exhibited mild swelling, uneven distribution of matrix, and a small number of cristae fractures. In the AUR group, mitochondria showed mild swelling, with no obvious disruption of cristae structure. In the DQ group, mitochondria demonstrated marked swelling and increased volume, matrix dissolution, loss and fragmentation of cristae, and extensive vacuolization. In contrast, the DQ+AUR group showed significantly reduced mitochondrial swelling, volume increase, matrix dissolution, cristae loss and fragmentation, and vacuolization compared to the DQ group. Compared with the DQ group, the DQ+AUR group exhibited significantly lower serum AST levels (U/L: 173.45 ± 23.60 vs. 255.33 ± 41.51), ALT levels (U/L: 51.77 ± 21.63 vs. 100.70 ± 32.35), and hepatic MDA levels ($\mu\text{mol/g}$: 12.40 ± 2.76 vs. 19.74 ± 4.10), along with higher hepatic GSH levels (mmol/g : 37.65 ± 14.95 vs. 20.58 ± 8.52) and SOD levels (kU/g : 124.10 ± 33.77 vs. 82.81 ± 22.00), the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). Western blotting showed upregulated Nrf2 expression (Nrf2/ β -actin: 0.87 ± 0.37 vs. 0.53 ± 0.22) and HO-1 expression (HO-1/ β -actin: 1.06 ± 0.22 vs. 0.49 ± 0.08), and downregulated Keap1 expression (Keap1/ β -actin: 0.82 ± 0.12 vs. 1.52 ± 0.76) and activated caspase-9 expression (activated caspase-9/ β -actin: 1.16 ± 0.28 vs. 1.71 ± 0.30) in the DQ+AUR group compared to the DQ group (all $P < 0.05$). **Conclusions** AUR attenuates DQ-induced acute liver injury in mice by activating the Keap1/Nrf2 signaling pathway.

[Key words] Auroptene; Diquat; Acute poisoning; Acute liver injury; Oxidative stress

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82060346)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20250113-00043

敌草快(diquat, DQ)化学名为 1, 1'-亚乙基-2, 2'-联吡啶, 是目前农业生产常用的除草剂。随着其应用越来越广泛, 因误服、自服等方式导致急性 DQ 中毒的病例逐年增多。DQ 中毒可引起肺、肝、肾功能及横纹肌在内的器官损伤^[1], 但肝脏作为体内主要的解毒器官, 容易受到 DQ 中毒的影响, 损伤尤其严重^[2-3]。DQ 通过引发氧化应激和脂质过氧化反应, 进而破坏肝细胞线粒体功能, 并促使肝细胞过度凋亡^[4-5]。在这一过程中, Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)/核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 信号通路扮演了关键的角色, 该通路是抗氧化应激反应的核心调节机制, 能够激活多种与氧化还原和解毒相关的基因, 从而增强细胞对氧化应激的防御能力。Keap1 为 E3 泛素连接酶, 能与 Nrf2 结合并将其泛素化, 通过泛素-蛋白酶体途径将其降解。在正常情况下, Nrf2 与 Keap1 结合并处于低水平, 以防止其激活下游基因。然而, 在氧化应激条件下, Nrf2 与 Keap1 解耦联后, Nrf2 进入细胞核并与下游元件结合, 激活抗氧化应激相关基因, 从而起到保护细胞的作用^[6-7]。

橙皮油素(auroptene, AUR)亦称为 7-乙氧基香豆素, 广泛存在于芸香科柑橘属水果的果皮中, 具有抗炎、抗氧化等药理作用^[8]。有研究表明, AUR 具有多种药理作用, 包括抗氧化、抗炎、抗癌、神经保护和免疫调节特性等^[9-13]。尽管 AUR 已被证实具有广泛的生物活性, 但其在 DQ 中毒后对肝脏的

保护作用及其机制尚未得到充分研究。已有研究表明, AUR 能够通过 Nrf2/抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)机制诱导小鼠肝细胞中谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)的活性, 从而发挥抗氧化作用^[14]。然而, 关于 AUR 是否通过激活 Keap1/Nrf2 信号通路来缓解 DQ 中毒引发的氧化应激和炎症反应, 进而保护肝脏, 目前国内外鲜见相关文献报道, 该领域仍需深入探索。本研究旨在通过建立 DQ 中毒的体内模型, 探讨 AUR 是否通过激活 Keap1/Nrf2 信号通路对 DQ 中毒所致的肝脏损伤发挥保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物: SPF 级健康雄性 C57BL/6 小鼠, 体质量 $18 \sim 22$ g, 购自遵义医科大学实验动物中心, 动物许可证号: SCXK(黔)2021-0002。将动物饲养在遵义医科大学实验动物中心, 提供足够的食物和水源, 保证合适的光源和温度。实验之前动物适应环境至少 1 周。本研究中的动物照护和实验方案符合动物伦理学标准, 并获得贵州茅台医院医学伦理委员会批准(审批号: LSP-2022-013)。

1.2 主要仪器与试剂: 全自动多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 电泳仪(美国 Hoefer 公司); 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司); 多样品组织研磨仪(上海净信科技发展有限公司); DQ 水合物(上海阿拉丁生化科技股份有限公司); AUR(广州英维沃化工科技有限公司); 丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨

酶(aspartate aminotransferase, AST)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(南京建成生物有限公司);Nrf2 抗体、血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)抗体、Keap1 重组蛋白抗体、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 9(caspase-9)抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗鼠和山羊抗兔免疫球蛋白 G(immunoglobulin G, IgG)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司);二喹啉甲酸(bicinchoninic acid assay, BCA)蛋白浓度测定试剂盒、高效 RIPA 组织/细胞裂解液(北京索莱宝科技有限公司)。

1.3 动物分组与处理:将 40 只小鼠随机分为正常对照组(Control 组)、DQ 中毒模型组(DQ 组)、AUR 药物治疗组(DQ+AUR 组)及 AUR 药物对照组(AUR 组),每组 10 只。用纯水分别将 DQ、AUR 稀释为溶液。采用一次性腹腔注射 40 mg/kg DQ 纯水溶液 0.5 mL 的方法建立 DQ 中毒模型;Control 组和 AUR 组腹腔注射等量纯水。制模成功 4 h 后,DQ+AUR 组和 AUR 组灌胃 0.5 mg/kg AUR 纯水溶液 0.2 mL;Control 组和 DQ 组灌胃等量纯水;均每日 1 次,连续 7 d。7 d 后麻醉动物取血,安乐死后收集肝脏组织和血液样本进行后续实验指标检测。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 透射电镜下观察肝脏组织微结构:取小鼠肝脏前叶组织,减碎肝脏至 $<1\text{ mm}^3$,固定后予脱水、包埋、切片、染色处理,透射电镜下观察并采集图像。

1.4.2 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定血清 ALT、AST 水平:采用异氟烷麻醉小鼠后,通过摘除眼球取血法采集全血样本,室温条件下静置 1 h,以 3 000 r/min 的转速离心 10 min(离心半径 15 cm),分离上层血清。利用 ALT 和 AST 检测试剂盒,按照生产商提供的操作指南测定血清 ALT 和 AST 活性。实验过程中分别设置样品孔和对照孔,使用酶标仪在 510 nm 波长下测定各孔的吸光度(absorbance, A)值,最后根据标准曲线计算 ALT 和 AST 水平。

1.4.3 肝脏组织 GSH、SOD、MDA 测定^[15]:取肝脏组织,用冰冻生理盐水洗去血污,滤纸吸干后,准确称取 0.5 g 肝脏组织,用冰生理盐水制成 10% 匀浆,以 7 000 r/min 冷冻离心(离心半径 10 cm),分离上清液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存上清液待测,分别采用水溶性四氮

唑-1(water-soluble tetrazolium-1, WST-1)法、硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)法和酶促反应法检测肝脏组织 GSH、SOD 和 MDA 水平。

1.4.4 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测肝脏组织 Keap1/Nrf2 信号通路相关蛋白的表达水平:从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出约豌豆大小的肝脏组织样本,置于小离心管中并放在冰上。按照试剂说明书向组织中加入适量 RIPA 裂解液、苯甲磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)及蛋白磷酸酶抑制剂,将组织剪碎并用匀浆机研磨,在冰上裂解 20 min。以 12 000 r/min 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 30 min,收集上清液进行蛋白定量。取 100 μL 蛋白样品与 25 μL $5\times$ 上样缓冲液混合,置于加热器中 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min,冷却后储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。配制 10% 分离胶和 5% 浓缩胶进行电泳,随后转膜封闭 2 h。一抗在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 12 h 以上,用含吐温 20 的 Tris 缓冲液(Tris-buffered saline with Tween 20, TBST)洗涤 3 次,每次 15 min。二抗在室温下摇晃孵育 2 h,再次用 TBST 溶液洗涤 3 次,每次 15 min。采用电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)法检测肝脏组织 Nrf2、Keap1、活化 caspase-9、HO-1 蛋白条带,以目的蛋白与内参蛋白 β -actin 的灰度值比值反映目的蛋白表达。

1.5 统计学处理:使用 SPSS 19.0 统计软件处理数据。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),若方差齐性,组间两两比较采用 LSD 法;若方差不齐,则使用 Dunnett's T_3 法进行差异检验。检验水准 α 值取双侧 0.05。

2 结果

2.1 肝脏组织结构变化(图 1):透射电镜下显示,Control 组线粒体轻度肿胀,基质分布不均,嵴结构少量断裂;AUR 组线粒体轻度肿胀,嵴结构未见明显断裂;DQ 组线粒体显著肿胀、体积增大,基质溶解,嵴结构断裂缺失,且大面积空泡化;DQ+AUR 组线粒体肿胀、体积增大、基质溶解、嵴结构断裂缺失及空泡化较 DQ 组明显减轻。

2.2 血清 AST 和 ALT 水平(表 1):与 Control 组比较,DQ 组小鼠血清 AST 和 ALT 水平均显著升高(均 $P < 0.05$);与 DQ 组比较,DQ+AUR 组小鼠血清 AST 和 ALT 水平均显著下降(均 $P < 0.05$)。表明 AUR 处理可有效抑制 DQ 中毒小鼠血清 AST 和 ALT 水平的显著增加。

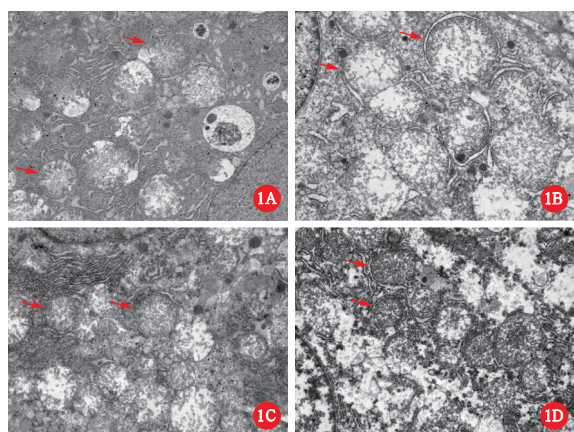


图1 透射电镜下观察各组小鼠制模7 d后肝组织细胞线粒体结构改变 红色箭头所示为线粒体结构。正常对照组(Control组)线粒体轻度肿胀,基质不均,嵴少量断裂;敌草快(DQ)中毒模型组(DQ组,B)线粒体损伤程度相对较高,严重肿胀,体积增大,基质溶解,嵴断裂缺失,大面积空泡化;橙皮素(AUR)药物治疗组(DQ+AUR组,C)线粒体膜结构模糊,基质变浅,嵴部分断裂、变短,轻度扩张,少量线粒体膜破损;AUR药物对照组(AUR组,D)线粒体轻度肿胀,嵴未见明显断裂 醋酸铀-枸橼酸铅双重染色 $\times 20\,000$

表1 各组小鼠血清AST和ALT水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	AST(U/L)	ALT(U/L)
Control组	10	131.66 $\pm$ 9.88	42.78 $\pm$ 13.33
DQ组	10	255.33 $\pm$ 41.51 ^a	100.70 $\pm$ 32.35 ^a
DQ+AUR组	10	173.45 $\pm$ 23.60 ^b	51.77 $\pm$ 21.63 ^b
AUR组	10	135.19 $\pm$ 18.29	42.48 $\pm$ 15.14
F值		48.74	16.15
P值		<0.001	<0.001

注:Control组为正常对照组,DQ组为敌草快(DQ)中毒模型组,DQ+AUR组为橙皮素(AUR)药物治疗组,AUR组为AUR药物对照组;AST为天冬氨酸转氨酶,ALT为丙氨酸转氨酶;与Control组比较,^a $P<0.05$;与DQ组比较,^b $P<0.05$

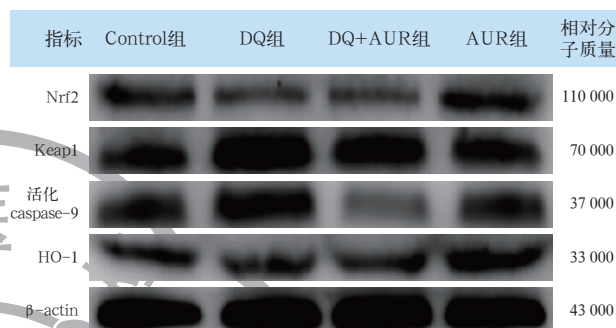
2.3 肝脏组织GSH、SOD和MDA水平(表2):与Control组比较,DQ组小鼠肝脏组织MDA水平显著升高,GSH和SOD水平显著降低(均 $P<0.05$);与DQ组比较,DQ+AUR组小鼠肝脏组织MDA水平显著降低,GSH和SOD水平显著升高(均 $P<0.05$)。表明AUR可有效降低DQ中毒小鼠肝脏组织MDA含量,提升GSH和SOD活性。

表2 各组小鼠血清GSH、SOD和MDA水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	GSH(mmol/g)	SOD(kU/g)	MDA(μ mol/g)
Control组	10	46.98 $\pm$ 22.10	135.00 $\pm$ 35.22	7.75 $\pm$ 2.27
DQ组	10	20.58 $\pm$ 8.52	82.81 $\pm$ 22.00	19.74 $\pm$ 4.10
DQ+AUR组	10	37.65 $\pm$ 14.95 ^a	124.10 $\pm$ 33.77 ^a	12.40 $\pm$ 2.76 ^a
AUR组	10	45.97 $\pm$ 21.08	136.19 $\pm$ 29.56	7.31 $\pm$ 1.77
F值		4.86	6.73	41.79
P值		0.006	<0.001	<0.001

注:Control组为正常对照组,DQ组为敌草快(DQ)中毒模型组,DQ+AUR组为橙皮素(AUR)药物治疗组,AUR组为AUR药物对照组;GSH为还原型谷胱甘肽,SOD为超氧化物歧化酶,MDA为丙二醛;与DQ组比较,^a $P<0.05$

2.4 肝脏组织氧化应激及凋亡蛋白表达(图2;表3):与DQ组比较,DQ+AUR组肝脏组织Nrf2和HO-1蛋白表达均显著升高,Keap1和活化caspase-9蛋白表达均显著降低(均 $P<0.05$)。表明AUR治疗可促进抗氧化蛋白Nrf2、HO-1表达,抑制凋亡相关蛋白活化caspase-9表达,减轻DQ中毒诱导的C57BL/6小鼠急性肝脏损伤。



Control组为正常对照组,DQ组为敌草快(DQ)中毒模型组,DQ+AUR组为橙皮素(AUR)药物治疗组,AUR组为AUR药物对照组;Nrf2为核因子E2相关因子2,Keap1为Kelch样ECH相关蛋白1,caspase-9为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶9,HO-1为血红素加氧酶-1, β -actin为 β -肌动蛋白

图2 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组小鼠制模7 d后肝组织氧化应激蛋白及凋亡相关蛋白的蛋白表达

表3 各组小鼠制模7 d后肝组织氧化应激蛋白和凋亡相关蛋白的蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	Nrf2/ β -actin	Keap1/ β -actin	活化caspase-9/ β -actin	HO-1/ β -actin
Control组	10	0.92 $\pm$ 0.37	0.92 $\pm$ 0.25	0.90 $\pm$ 0.15	0.96 $\pm$ 0.20
DQ组	10	0.53 $\pm$ 0.22 ^a	1.52 $\pm$ 0.76 ^a	1.71 $\pm$ 0.30 ^a	0.49 $\pm$ 0.08 ^a
DQ+AUR组	10	0.87 $\pm$ 0.37 ^b	0.82 $\pm$ 0.12 ^b	1.16 $\pm$ 0.28 ^b	1.06 $\pm$ 0.22 ^b
AUR组	10	1.40 $\pm$ 0.78	1.07 $\pm$ 0.23	0.63 $\pm$ 0.13	1.17 $\pm$ 0.36
F值		20.154	15.527	17.236	32.750
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:Control组为正常对照组,DQ组为敌草快(DQ)中毒模型组,DQ+AUR组为橙皮素(AUR)药物治疗组,AUR组为AUR药物对照组;Nrf2为核因子E2相关因子2,Keap1为Kelch样ECH相关蛋白1,caspase-9为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶9,HO-1为血红素加氧酶-1, β -actin为 β -肌动蛋白;与Control组比较,^a $P<0.05$;与DQ组比较,^b $P<0.05$

3 讨论

DQ主要通过氧化应激干扰线粒体呼吸链的电子传递,在细胞内产生活性氧和活性氮,导致细胞功能障碍^[5,16]。随着活性氧或活性氮大量增加,细胞内的还原性物质(如GSH)或抗氧化酶[如SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)、过氧化氢酶(catalase,CAT)]被耗竭,导致细胞氧化应激损伤^[17]。有研究表明,激活Keap1/Nrf2信号通路可增加Nrf2、HO-1等蛋白表达,增强肝脏组织SOD、GSH-Px和CAT活性,降低肝组织MDA水平,

改善氧化应激损伤^[18]。

本研究于电镜下观察各组小鼠肝脏组织,结果显示,DQ 组肝细胞线粒体存在严重的结构损伤,具体表现为明显的肿胀、体积增大、基质溶解、嵴断裂缺失及大面积空泡化。提示 DQ 中毒可迅速损害肝细胞内的线粒体,进而破坏细胞能量代谢和维持细胞稳态的功能,从而导致肝脏急性损伤。相较于 DQ 组,DQ+AUR 组的肝细胞线粒体损伤明显减轻,表现为肿胀程度降低、嵴结构保存较好以及空泡化现象减少。提示 AUR 治疗具有明显的保护作用,可能通过改善线粒体结构完整性和功能,从而减轻因 DQ 中毒引起的细胞能量代谢障碍和细胞损伤。

本研究在 C57BL/6 小鼠急性 DQ 中毒模型中观察到,DQ 中毒小鼠血清 AST 和 ALT 水平显著升高,提示急性 DQ 中毒可引起明显的急性肝脏损伤,与既往研究结果一致,进一步验证了 DQ 对肝脏的毒性作用。值得注意的是,经 AUR 处理后,DQ+AUR 组小鼠的血清 AST 和 ALT 水平较 DQ 中毒模型组明显下降,说明 AUR 治疗能有效减轻因 DQ 中毒引起的肝功能异常,具有明显的肝脏保护作用。

本研究结果还显示,与 Control 组相比,DQ 组小鼠肝组织氧化应激指标显著异常,具体表现为 MDA 水平显著升高,而抗氧化指标 GSH 和 SOD 水平显著降低。表明 DQ 中毒诱导了明显的氧化应激反应,进一步加剧了肝细胞损伤。与此同时,DQ 组肝组织关键抗氧化和细胞保护相关蛋白 Nrf2 及其下游效应分子 HO-1 的表达水平明显降低,而负调控因子 Keap1 及细胞凋亡相关蛋白活化 caspase-9 表达水平明显升高,提示 DQ 中毒不仅引发氧化应激,还伴随着细胞凋亡通路的激活。值得关注的是,经 AUR 处理后,DQ+AUR 组肝组织的 MDA 水平明显降低,GSH 和 SOD 水平显著回升,表明 AUR 能显著改善 DQ 中毒所致的氧化损伤;同时,DQ+AUR 组肝组织 Nrf2 和 HO-1 蛋白水平显著升高,而 Keap1 和活化 caspase-9 蛋白水平则显著降低。提示 AUR 通过激活 Nrf2 信号通路,增强细胞内抗氧化能力,并抑制细胞凋亡,从而发挥对 DQ 中毒诱发的氧化应激、炎症反应及细胞凋亡的保护作用。

综上所述,本研究表明,AUR 在缓解 DQ 中毒诱导的小鼠急性肝脏损伤及细胞损伤中发挥了显著的保护作用,其潜在机制可能涉及多重途径。首先,AUR 通过激活 Keap1/Nrf2 信号通路,显著上调了 Nrf2 及其下游抗氧化分子 HO-1 的表达,增强了

细胞内的抗氧化防御能力。其次,AUR 处理抑制了活化 caspase-9 的生成,从而有效减少了细胞凋亡的发生。此外,AUR 还通过增加抗氧化酶 GSH 和 SOD 水平,以及降低细胞 MDA 含量,从根本上抑制了氧化应激和脂质过氧化反应。以上机制协同作用,共同减轻了 DQ 中毒引起的急性肝脏损伤和细胞损伤,为 AUR 在 DQ 中毒所致急性肝损伤干预中的应用提供了坚实的理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 杨洋,许巍.9 例敌草快中毒患儿的急性期临床特点和随访结局[J].中国中西医结合急救杂志,2024,31(2):213-217. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2024.02.017.
- [2] Jović-Stosić J, Babić G, Todorović V. Fatal diquat intoxication [J]. Vojnosanit Pregl, 2009, 66 (6): 477-481. DOI: 10.2298/vsp0906477j.
- [3] Saeed SA, Wilks MF, Coupe M. Acute diquat poisoning with intracerebral bleeding [J]. Postgrad Med J, 2001, 77 (907): 329-332. DOI: 10.1136/pmj.77.907.329.
- [4] Chen YN, Chen YP, Zhang H, et al. Pterostilbene as a protective antioxidant attenuates diquat-induced liver injury and oxidative stress in 21-day-old broiler chickens [J]. Poult Sci, 2020, 99 (6): 3158-3167. DOI: 10.1016/j.psj.2020.01.021.
- [5] Chen YP, Gu YF, Zhao HR, et al. Dietary squalene supplementation alleviates diquat-induced oxidative stress and liver damage of broiler chickens [J]. Poult Sci, 2021, 100 (3): 100919. DOI: 10.1016/j.psj.2020.12.017.
- [6] Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2013, 53: 401-426. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320.
- [7] 王建红,刘同英,周满红.敌草快中毒与 Nrf2 信号通路关系的研究进展[J].中华危重病急救医学,2022,34(4):444-448. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210816-01185.
- [8] Bibak B, Shakeri F, Barreto GE, et al. A review of the pharmacological and therapeutic effects of auraptene [J]. Biofactors, 2019, 45 (6): 867-879. DOI: 10.1002/biof.1550.
- [9] Askari VR, Baradaran Rahimi V, Rezaee SA, et al. Auraptene regulates Th1/Th2/TReg balances, NF-κB nuclear localization and nitric oxide production in normal and Th2 provoked situations in human isolated lymphocytes [J]. Phytomedicine, 2018, 43: 1-10. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.03.049.
- [10] Askari VR, Rahimi VB, Zargarani R, et al. Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of auraptene on phytohemagglutinin (PHA)-induced inflammation in human lymphocytes [J]. Pharmacol Rep, 2021, 73 (1): 154-162. DOI: 10.1007/s43440-020-00083-5.
- [11] Fiorito S, Epifano F, Palumbo L, et al. A novel auraptene-enriched citrus peels-based blend with enhanced antioxidant activity [J]. Plant Foods Hum Nutr, 2021, 76 (3): 397-398. DOI: 10.1007/s11130-021-00911-w.
- [12] Kesbavari Z, Amiresmaili S, Shahrokhi N, et al. Neuroprotective effects of auraptene following traumatic brain injury in male rats: The role of oxidative stress [J]. Brain Res Bull, 2021, 177: 203-209. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2021.09.021.
- [13] Tayarani-Najaran Z, Tayarani-Najaran N, Eghbali S. A review of auraptene as an anticancer agent [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 698352. DOI: 10.3389/fphar.2021.698352.
- [14] Prince M, Li Y, Childers A, et al. Comparison of citrus coumarins on carcinogen-detoxifying enzymes in Nrf2 knockout mice [J]. Toxicol Lett, 2009, 185 (3): 180-186. DOI: 10.1016/j.toxlet.2008.12.014.
- [15] 熊爱华,齐春丽,王欣,等.红外频谱照射和超低频电磁场处理水对高脂饮食诱致大鼠非酒精性脂肪肝的保护作用[J].中国老年学杂志,2022,42(23):5853-5858. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2022.23.047.
- [16] Zhang H, Chen YN, Chen YP, et al. Comparison of the effects of resveratrol and its derivative pterostilbene on hepatic oxidative stress and mitochondrial dysfunction in piglets challenged with diquat [J]. Food Funct, 2020, 11 (5): 4202-4215. DOI: 10.1039/d0fo00732c.
- [17] Jia PL, Ji SL, Zhang H, et al. Picetannol ameliorates hepatic oxidative damage and mitochondrial dysfunction of weaned piglets challenged with diquat [J]. Animals (Basel), 2020, 10 (7): 1239. DOI: 10.3390/ani10071239.
- [18] Zhou R, Lin JJ, Wu DF. Sulforaphane induces Nrf2 and protects against CYP2E1-dependent binge alcohol-induced liver steatosis [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840 (1): 209-218. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.09.018.

(收稿日期:2025-01-13)

(责任编辑:张耘菲)