

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.23.006

紫檀芪调节 Keap-1/Nrf2/HO-1 信号通路对非酒精性脂肪肝大鼠氧化应激和细胞凋亡的影响*

沈新辉¹ 周晓玲^{2Δ} 刘琳¹ 王月明² 黄华萍¹ 罗艺¹

(1 广西中医药大学研究生院 广西 南宁 530200; 2 柳州市中医医院消化内科 广西 柳州 545001)

摘要 目的:研究紫檀芪调节 Kelch 样 ECH 关联蛋白 1(Keap-1)/核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)/血红素加氧酶-1(HO-1)信号通路对非酒精性脂肪肝(NAFLD)大鼠氧化应激和细胞凋亡的影响。**方法:**将 60 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、紫檀芪低剂量组(30 mg/kg)、紫檀芪高剂量组(60 mg/kg)、紫檀芪(60 mg/kg)+N-(4-(2,3-二氢-1-(2'-甲基苯甲酰)-1H-吡啶-5-基)-5-甲基-2-噻唑基)-1,3-苯并二氧唑-5-乙酰胺(ML385)(30 mg/kg)组,每组 12 只。模型组与药物干预组大鼠以高脂饲料饲养诱导 NAFLD 模型,对照组大鼠以普通饲料饲养,各组连续喂养 12 周。以紫檀芪和 ML385 分组处理 14 d 后(对照组以等剂量生理盐水处理),检测各组大鼠脂代谢指标[三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)及游离脂肪酸(FFA)水平]、肝指数、肝功能指标[谷丙转氨酶(ALT)及谷草转氨酶(AST)]水平、血清白细胞介素(IL)-17、IL-6、IL-10、氧化应激指标[丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)及过氧化氢酶(CAT)]水平;原位末端标记法(TUNEL)染色检测各组大鼠肝细胞凋亡率;蛋白免疫印迹法检测各组大鼠肝组织凋亡相关蛋白及 Keap-1/Nrf2/HO-1 通路相关蛋白表达。**结果:**与对照组相比,模型组大鼠血清 IL-10、SOD 及 CAT 水平、肝组织 Nrf2、HO-1、Bcl-2 表达水平显著降低($P<0.05$),TG、TC 及 FFA 水平、肝指数、ALT 及 AST 水平、血清 IL-17、IL-6、MDA 水平、肝细胞凋亡率、肝组织 Keap-1 及 Bax 表达水平显著升高($P<0.05$)。与模型组相比,紫檀芪低、高剂量组大鼠血清 IL-10、SOD 及 CAT 水平、肝组织 Nrf2、HO-1、Bcl-2 表达水平均升高($P<0.05$),TG、TC 及 FFA 水平、肝指数、ALT 及 AST 水平、血清 IL-17、IL-6、MDA 水平、肝细胞凋亡率、肝组织 Keap-1、Bax 表达水平均降低($P<0.05$);与紫檀芪低剂量组相比,紫檀芪高剂量组大鼠血清 IL-10、SOD 及 CAT 水平、肝组织 Nrf2、HO-1、Bcl-2 表达水平升高($P<0.05$),TG、TC 及 FFA 水平、肝指数、ALT 及 AST 水平、血清 IL-17、IL-6、MDA 水平、肝细胞凋亡率、肝组织 Keap-1 及 Bax 表达水平降低($P<0.05$);与紫檀芪高剂量组相比,紫檀芪+ML385 组大鼠血清 IL-10、SOD 及 CAT 水平、肝组织 Nrf2、HO-1、Bcl-2 表达水平降低($P<0.05$),TG、TC 及 FFA 水平、肝指数、ALT 及 AST 水平、血清 IL-17、IL-6、MDA 水平、肝细胞凋亡率、肝组织 Bax 表达水平升高($P<0.05$)。**结论:**紫檀芪可能通过激活 Keap-1/Nrf2/HO-1 信号通路,改善 NAFLD 大鼠脂代谢水平,调节炎症反应及氧化应激,减轻肝组织脂肪变性及细胞凋亡。

关键词:紫檀芪;Keap-1/Nrf2/HO-1 信号通路;非酒精性脂肪肝;氧化应激;细胞凋亡

中图分类号:R-33;R575;R243 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)23-4434-07

Effects of Pterostilbene on Oxidative Stress and Apoptosis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Rats by Regulating Keap-1/Nrf2/HO-1 Signaling Pathway*

SHEN Xin-hui¹, ZHOU Xiao-ling^{2Δ}, LIU Lin¹, WANG Yue-ming², HUANG Hua-ping¹, LUO Yi¹

(1 Graduate School of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530200, China;

2 Department of Gastroenterology, Liuzhou Traditional Chinese Medicine Hospital, Liuzhou, Guangxi, 545001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of pterostilbene on oxidative stress and apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) rats by regulating Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap-1)/nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling pathway. **Methods:** 60 SD rats were randomly divided into control group, model group, pterostilbene low-dose group (30 mg/kg), pterostilbene high-dose group (60 mg/kg), pterostilbene (60 mg/kg)+N-(4-(2,3-dihydro-1-(2'-methylbenzoyl)-1H-indole-5-yl)-5-methyl-2-thiazolyl)-1,3-benzodioxazol-5-acetamide (ML385) (30 mg/kg) group, with 12 rats in each group. Rats in model group and drug intervention group were fed with high-fat diet to induce NAFLD model, and rats in control group were fed with normal diet, each group was continuously fed for 12 weeks. 14 days after treatment with pterostilbene and ML385 groups (control group was treated with the same dose of normal saline), the lipid metabolism indexes [triglyceride (TG), total cholesterol (TC) and free fatty acid (FFA) levels], liver index, liver function indexes [alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST)] levels, serum interleukin (IL)-17, IL-6, IL-10, oxidative stress indexes [malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and catalase

* 基金项目:广西壮族自治区(青年)岐黄学者培养项目(柳财预追 2023[172 号])

作者简介:沈新辉(1995-),男,在读硕士研究生,研究方向:中医内科学、针灸推拿学,E-mail: 13078030947@163.com

Δ 通讯作者:周晓玲(1977-),女,博士,主任医师,研究方向:中医肝病防治,E-mail: zxl_lz@163.com

(收稿日期:2023-09-01 接受日期:2023-09-18)

(CAT)] levels were detected in each group. The apoptosis rate of hepatocytes in each group were detected by in situ end labeling method (TUNEL) staining. The expression of apoptosis-related proteins and Keap-1/Nrf2/HO-1 pathway-related proteins in liver tissue of rats in each group were detected by western blotting. **Results:** Compared with control group, the levels of serum IL-10, SOD and CAT, the expression levels of Nrf2, HO-1 and Bcl-2 in liver tissue of rats in model group were significantly decreased ($P<0.05$), and the levels of TG, TC and FFA, liver index, ALT and AST levels, serum IL-17, IL-6, MDA levels, hepatocyte apoptosis rate, liver tissue Keap-1 and Bax expression levels were significantly increased ($P<0.05$). Compared with model group, the levels of serum IL-10, SOD and CAT, the expression levels of Nrf2, HO-1 and Bcl-2 in liver tissue of rats in pterostilbene low and high dose groups were increased ($P<0.05$), and the levels of TG, TC and FFA, liver index, ALT and AST, serum IL-17, IL-6, MDA, hepatocyte apoptosis rate, the expression levels of Keap-1 and Bax in liver tissue were decreased ($P<0.05$). Compared with pterostilbene low-dose group, the levels of serum IL-10, SOD and CAT, and the expression levels of Nrf2, HO-1 and Bcl-2 in liver tissue were increased in pterostilbene high-dose group ($P<0.05$), and the levels of TG, TC and FFA, liver index, ALT and AST, serum IL-17, IL-6, MDA, hepatocyte apoptosis rate, and the expression levels of Keap-1 and Bax in liver tissue were decreased ($P<0.05$). Compared with pterostilbene high-dose group, the levels of serum IL-10, SOD and CAT, and the expression levels of Nrf2, HO-1 and Bcl-2 in liver tissue of pterostilbene+ML385 group were decreased ($P<0.05$), and the levels of TG, TC and FFA, liver index, ALT and AST, serum IL-17, IL-6, MDA, hepatocyte apoptosis rate, and liver tissue Bax expression level were increased ($P<0.05$). **Conclusion:** Pterostilbene may improve lipid metabolism, regulate inflammatory response and oxidative stress, and reduce hepatic steatosis and apoptosis in NAFLD rats by activating Keap-1/Nrf2/HO-1 signaling pathway.

Key words: Pterostilbene; Keap-1/Nrf2/HO-1 signaling pathway; Nonalcoholic fatty liver disease; Oxidative stress; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R575; R243 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)23-4434-07

前言

非酒精性脂肪肝病(NAFLD)是临床中常见的慢性肝病之一,是指肝脏在病毒、自身免疫性炎症、药物等各种因素作用下发生脂肪变性,引发肝细胞凋亡坏死,甚至导致脂肪性肝炎、肝硬化、肝纤维化和肝癌等严重病变^[1,2]。脂类物质聚集极易导致活性氧水平升高,引发肝脏炎症反应和氧化应激,造成肝细胞变性凋亡,在 NAFLD 发病及病情进展过程中发挥关键作用。研究表明,通过抑制肝脏氧化应激和炎症反应可改善 NAFLD 动物模型肝脏脂肪变性、炎性细胞浸润及纤维化情况^[3,4]。Kelch 样 ECH 关联蛋白 1(Keap-1)/核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)/血红素加氧酶-1(HO-1)是机体重要的氧化应激和炎症调控信号通路,与 NAFLD 发生发展密切相关,下调肝脏 Keap-1 表达可上调 Nrf2 和 HO-1 表达,减轻脂质和活性氧积累,抑制氧化应激,改善 NAFLD 小鼠症状^[5,6],还可抑制肝细胞凋亡,有效减轻甲氨蝶呤诱导的肝毒性^[7]。紫檀芪是白藜芦醇的一种二甲基类似物,具有抗炎、抗纤维化、免疫调节及抗氧化等多种药理活性^[8]。芦雅丽^[9]等的研究显示,紫檀芪可降低肝组织 Keap-1 表达,上调 Nrf2 表达,抑制氧化应激,减轻对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤。本研究拟通过建立 NAFLD 大鼠模型,探讨紫檀芪基于 Keap-1/Nrf2/HO-1 信号通路对 NAFLD 大鼠氧化应激和细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

60 只健康 SD 雄性大鼠由广西中医药大学提供,动物生产许可证号为 SYXK 桂 2019-0001,SPF 级,均为 6 周龄左右,体重 190~210 g。大鼠饲养在温度为 23~25℃、湿度为 50~60% 的动物房内,保持屏障环境,每小时通风换气 9~11 次,明暗各 12 h 循环照明。本实验已获得广西中医药大学动物伦理委员

会批准。

1.2 主要试剂及仪器

N-(4-(2,3-二氢-1-(2'-甲基苯甲酰)-1H-吡啶-5-基)-5-甲基-2-噻唑基)-1,3-苯并二氧唑-5-乙酰胺(ML385)(纯度:99%,货号:M304758)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;紫檀芪标准品(纯度:HPLC≥98%,货号:SP9570)、原位末端标记法(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒(货号:T2190)、大鼠(IL)-17 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(货号:SEKR-0007)购于北京索莱宝科技有限公司;大鼠 IL-10 ELISA 试剂盒(货号:ab214566)、大鼠 IL-6 ELISA 试剂盒(货号:ab100772)、兔源抗大鼠 Keap1(货号:ab139729)一抗、兔源抗大鼠 Nrf2(货号:ab137550)一抗、兔源抗大鼠 HO-1 一抗(货号:ab13243)购于美国 Abcam 公司;丙二醛(MDA)检测试剂盒(货号:S0131S)、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(货号:S0109)、过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒(货号:S0051)、蛋白提取试剂盒(货号:P0027)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗(货号:A0208)、二喹啉甲酸(BCA)试剂盒(货号:P0011)、兔源抗大鼠β-Actin 一抗(货号:AF5003)购于上海碧云天生物技术有限公司。

全自动生化分析仪(型号:BS-240VET)购于北京瑞科中仪科技有限公司;冰冻切片机(型号:LD-3060V)购于山东安屿生物科技有限公司;倒置光学显微镜(型号 GX53)购于日本奥林巴斯公司;全波长微孔板酶标仪(型号 Multiskan SkyHigh)购于美国赛默飞世尔科技公司;多功能电子天平(型号 JD500-2)购于沈阳众畅享科技有限公司;蛋白电泳与转膜仪(型号 Mini PROTEAN)、化学发光凝胶成像仪(型号 Transilluminator)购于美国伯乐公司等。

1.3 方法

1.3.1 NAFLD 大鼠模型构建及分组 参考文献^[10]建立 NAFLD 大鼠模型:以高脂饲料喂养 48 只健康 SD 雄性大鼠 12 周后,检测到大鼠血脂升高、肝功能指标谷丙转氨酶(ALT)和

谷草转氨酶(AST)水平下降,随机选取 5 只大鼠断头处死后制备肝组织石蜡切片进行病理检测,若每单位切片面积中有超过 1/3 的肝细胞发生脂肪变性,可判定 NAFLD 模型建立成功,共成功建模 48 只,并将其随机分为模型组、紫檀芪低剂量组(30 mg/kg)、紫檀芪高剂量组(60 mg/kg)、紫檀芪(60 mg/kg)+ML385 组(30 mg/kg),每组 12 只。再取 12 只健康 SD 雄性大鼠,造模的同时以普通饲料饲养 12 周,作为对照组。

紫檀芪以二甲基亚砜(DMSO)溶解配制为 30 mg/mL 的储备液,然后以蒸馏水稀释为 3.6 mg/mL 的药液^[9],ML385 以生理盐水溶解配制为 3 mg/mL 的药液^[11],紫檀芪+ML385 组大鼠灌胃 10 mL/kg 的 6 mg/mL 的紫檀芪药液,同时腹腔注射 10 mL/kg 的 Nrf2/HO-1 信号抑制剂 ML385 药液;紫檀芪低、高剂量组大鼠分别灌胃 10 mL/kg 的 3.6 mg/mL 的紫檀芪药液,同时腹腔注射 10 mL/kg 的生理盐水;对照组与模型组大鼠灌胃 10 mL/kg 的 20% DMSO 溶液,同时腹腔注射 10 mL/kg 的生理盐水,每天给药 1 次,各组大鼠均干预 14 d。

1.3.2 大鼠肝功能、血脂、肝指数检测 各组大鼠于第 14 次给药后 24 h,进行麻醉处理(吸入乙醚),采集大鼠颈动脉血 2 mL,平均分为两份。选其中一份使用全自动生化分析仪测定脂代谢指标[三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、游离脂肪酸(FFA)]水平及肝功能指标[谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)]水平;再次采集颈动脉血 1.2 mL,离心(500×g,4℃)10 min 后将血清存在 -80℃冰箱中备用;测出大鼠体重后断头处死,开腹取肝脏,测量其重量,计算肝指数=肝脏湿重(g)/处死前体重(g)×100%;每只大鼠自取出的肝脏上剪下约 0.4 g 肝组织,加入蛋白提取试剂后上下匀浆、离心后,以 BCA 法测量上清中总蛋白浓度,根据测量结果将各组总蛋白浓度调整至相等后存在 -80℃冰箱中备用。每只大鼠剩余的肝脏洗涤、固定过夜、冷冻成块后切片备用。

1.3.3 大鼠血清炎症及氧化应激相关因子水平检测 将 1.3.2 中另一份血清样本提前取出,置于 4℃冻融,采用试剂盒通过

ELISA 实验测量其中炎症因子(白细胞介素 IL-17、IL-6、IL-10)、氧化应激因子(MDA、SOD、CAT)水平,具体操作步骤参照试剂盒的说明指导进行。

1.3.4 大鼠肝细胞凋亡检测 将 1.3.2 中的切片提前取出,室温下静置 5 min 后以冰丙酮固定、TUNEL 染色、洗涤、透明、封片,采用显微镜观察肝细胞着色情况,其中呈棕色或深棕色的为凋亡细胞,采集任意 6 个视野后运用 Image J 软件分析计算肝细胞凋亡率,肝细胞凋亡率=凋亡细胞数/总细胞数×100%。

1.3.5 蛋白免疫印迹法检测大鼠肝组织凋亡蛋白及 Keap-1/Nrf2/HO-1 通路蛋白表达 将 1.3.2 中肝组织蛋白样品提前取出,置于 4℃冻融,变性后进行电泳,通过湿转实验将分离蛋白移至硝酸纤维膜上,自膜上截下目的蛋白 Bcl-2、Bax、Keap-1、Nrf2、HO-1、 β -actin,以脱脂奶粉(质量分数 5%)封闭、孵育一抗(稀释比例均为 1:2000)、洗涤、孵育二抗(稀释比例为 1:1000)、洗涤、化学发光法显色后采集蛋白条带图像,运用 Image J 软件分析定量蛋白灰度值,进行统计后得到其相对表达水平。

1.4 统计学分析

以 GraphPad Prism 8.0 软件对实验数据进行统计分析。计量资料以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)的方式表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较进行单因素方差分析,两两比较行 LSD-*t* 检验。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 紫檀芪对 NAFLD 大鼠脂代谢的影响

与对照组相比,模型组大鼠血清 TG、TC、FFA 水平显著升高(*P*<0.05);与模型组相比,紫檀芪低、高剂量组大鼠血清 TG、TC、FFA 水平均降低(*P*<0.05);与紫檀芪低剂量组相比,紫檀芪高剂量组大鼠血清 TG、TC、FFA 水平降低(*P*<0.05);与紫檀芪高剂量组相比,紫檀芪+ML385 组大鼠血清 TG、TC、FFA 水平升高(*P*<0.05)。见表 1。

表 1 各组大鼠血清 TG、TC、FFA 水平对比($\bar{x}\pm s$, n=12)

Table 1 Comparison of serum TG, TC and FFA levels in each group of rats($\bar{x}\pm s$, n=12)

Groups	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	FFA(mmol/L)
Control group	1.36±0.08	1.05±0.06	0.49±0.07
Model group	3.25±0.24 ^a	2.96±0.17 ^a	1.62±0.15 ^a
Pterostilbene Low-dose group	2.40±0.18 ^{ab}	2.08±0.14 ^{ab}	1.03±0.08 ^{ab}
Pterostilbene High-dose group	1.48±0.13 ^{abc}	1.22±0.11 ^{abc}	0.44±0.06 ^{abc}
Pterostilbene+ML385 group	3.03±0.29 ^{acd}	2.88±0.20 ^{acd}	1.51±0.12 ^{acd}
<i>F</i>	51.352	64.318	58.941
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compare with control group, ^a*P*<0.05. Compare with model group, ^b*P*<0.05. Compare with pterostilbene low-dose group, ^c*P*<0.05. Compare with pterostilbene high-dose group, ^d*P*<0.05.

2.2 紫檀芪对 NAFLD 大鼠肝指数及肝功能的影响

与对照组相比,模型组大鼠肝指数及血清 ALT、AST 水平显著升高(*P*<0.05);与模型组相比,紫檀芪低、高剂量组大鼠肝指数及血清 ALT、AST 水平均降低(*P*<0.05);与紫檀芪低剂

量组相比,紫檀芪高剂量组大鼠肝指数及血清 ALT、AST 水平降低(*P*<0.05);与紫檀芪高剂量组相比,紫檀芪+ML385 组大鼠肝指数及血清 ALT、AST 水平升高(*P*<0.05)。见表 2。

表 2 各组大鼠肝指数及血清肝功能指标水平对比($\bar{x} \pm s$, n=12)Table 2 Comparison of liver index and serum liver function indexes of rats in each group($\bar{x} \pm s$, n=12)

Groups	Liver index(%)	ALT(U/L)	AST(U/L)
Control group	2.24±0.13	28.96±5.63	64.75±7.69
Model group	3.56±0.18 ^a	65.02±8.92 ^a	98.52±14.71 ^a
Pterostilbene low-dose group	2.95±0.11 ^{ab}	50.27±6.45 ^{ab}	84.06±12.83 ^{ab}
Pterostilbene High-dose group	2.37±0.07 ^{abc}	36.05±5.71 ^{abc}	74.43±9.62 ^{abc}
Pterostilbene+ML385 group	3.49±0.14 ^{acd}	62.84±7.26 ^{acd}	94.18±15.24 ^{acd}
<i>F</i>	54.378	24.745	38.356
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compare with control group, ^a*P*<0.05. Compare with model group, ^b*P*<0.05. Compare with pterostilbene low-dose group, ^c*P*<0.05. Compare with pterostilbene high-dose group, ^d*P*<0.05.

2.3 紫檀芪对 NAFLD 大鼠肝组织细胞凋亡的影响

与对照组相比,模型组大鼠肝细胞凋亡率显著升高(*P*<0.05);与模型组相比,紫檀芪低、高剂量组大鼠肝细胞凋亡率

均降低(*P*<0.05);与紫檀芪低剂量组相比,紫檀芪高剂量组大鼠肝细胞凋亡率降低(*P*<0.05);与紫檀芪高剂量组相比,紫檀芪+ML385组大鼠肝细胞凋亡率升高(*P*<0.05)。见图1、表3。

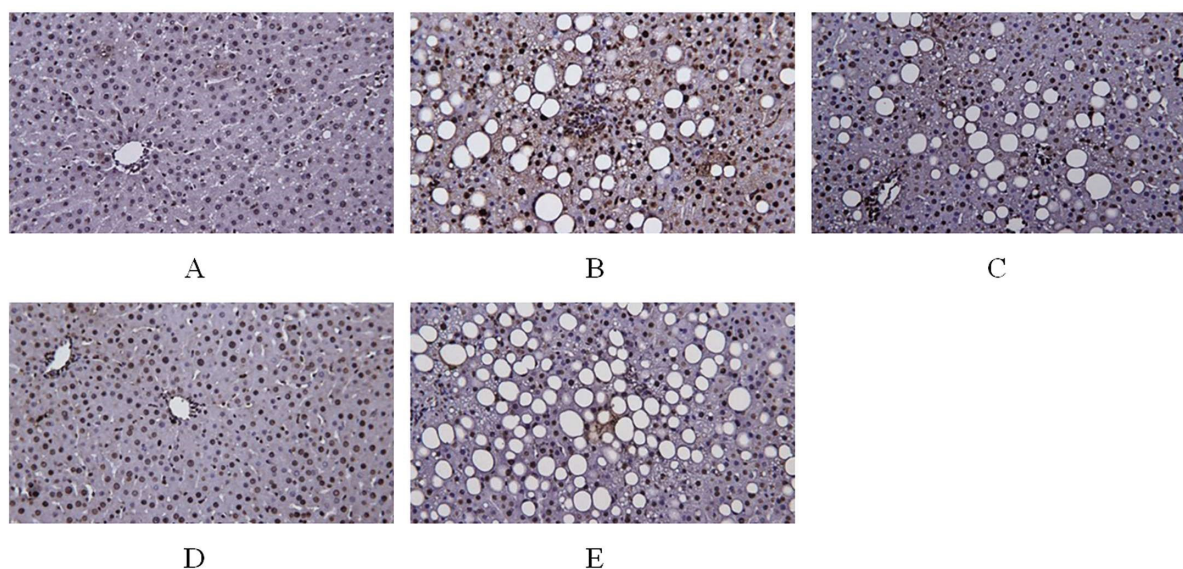


图 1 TUNEL 染色检测 NAFLD 大鼠肝组织细胞凋亡情况(×200)

Fig. 1 TUNEL staining was used to detect apoptosis in liver tissue of NAFLD rats (×200)

Note: A: control group; B: model group; C: pterostilbene low-dose group; D: pterostilbene high-dose group; E: pterostilbene+ML385 group.

表 3 各组大鼠肝细胞凋亡率对比($\bar{x} \pm s$, n=12)Table 3 Comparison of hepatocyte apoptosis rate in each group($\bar{x} \pm s$, n=12)

Groups	Apoptosis rate(%)
Control group	2.13±0.62
Model group	30.64±3.25 ^a
Pterostilbene low-dose group	18.53±2.13 ^{ab}
Pterostilbene High-dose group	4.92±1.14 ^{abc}
Pterostilbene+ML385 group	28.15±2.68 ^{acd}
<i>F</i>	17.249
<i>P</i>	<0.001

Note: Compare with control group, ^a*P*<0.05. Compare with model group, ^b*P*<0.05. Compare with pterostilbene low-dose group, ^c*P*<0.05. Compare with pterostilbene high-dose group, ^d*P*<0.05.

2.4 紫檀芪对 NAFLD 大鼠血清 IL-17、IL-6 及 IL-10 水平的影响

与对照组相比,模型组大鼠血清 IL-10 水平降低 ($P<0.05$),IL-17、IL-6 水平升高 ($P<0.05$);与模型组相比,紫檀芪低、高剂量组大鼠血清 IL-10 水平均升高 ($P<0.05$),IL-17、IL-6

水平均降低 ($P<0.05$);与紫檀芪低剂量组相比,紫檀芪高剂量组大鼠血清 IL-10 水平升高 ($P<0.05$),IL-17、IL-6 水平降低 ($P<0.05$);与紫檀芪高剂量组相比,紫檀芪 +ML385 组大鼠血清 IL-10 水平降低 ($P<0.05$),IL-17、IL-6 水平升高 ($P<0.05$)。见表 4。

表 4 各组大鼠血清 IL-17、IL-6 及 IL-10 水平对比 ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)
Table 4 Comparison of serum IL-17, IL-6 and IL-10 levels in each group of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

Groups	IL-17(pg/mL)	IL-6(ng/mL)	IL-10(pg/mL)
Control group	9.14±1.43	1.22±0.14	52.13±4.81
Model group	41.78±5.26 ^a	13.04±1.62 ^a	18.64±2.06 ^a
Pterostilbene low-dose group	26.56±3.17 ^{ab}	7.26±1.43 ^{ab}	34.15±3.32 ^{ab}
Pterostilbene High-dose group	11.35±2.01 ^{abc}	1.87±0.73 ^{abc}	45.82±5.03 ^{abc}
Pterostilbene+ML385 group	37.92±6.15 ^{acd}	11.94±2.05 ^{acd}	21.06±3.28 ^{acd}
<i>F</i>	19.326	57.468	25.289
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compare with control group, ^a $P<0.05$. Compare with model group, ^b $P<0.05$. Compare with pterostilbene low-dose group, ^c $P<0.05$. Compare with pterostilbene high-dose group, ^d $P<0.05$.

2.5 紫檀芪对 NAFLD 大鼠血清氧化应激因子水平的影响

与对照组相比,模型组大鼠血清 SOD、CAT 水平显著降低 ($P<0.05$),MDA 水平显著升高 ($P<0.05$);与模型组相比,紫檀芪低、高剂量组大鼠血清 SOD、CAT 水平均升高 ($P<0.05$),MDA 水平均降低 ($P<0.05$);与紫檀芪低剂量组相比,紫檀芪

高剂量组大鼠血清 SOD、CAT 水平升高 ($P<0.05$),MDA 水平降低 ($P<0.05$);与紫檀芪高剂量组相比,紫檀芪 +ML385 组大鼠血清 SOD、CAT 水平降低 ($P<0.05$),MDA 水平升高 ($P<0.05$)。见表 5。

表 5 各组大鼠血清 SOD、CAT 及 MDA 水平对比 ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)
Table 5 Comparison of serum SOD, CAT and MDA levels in each group of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

Groups	SOD(U/L)	CAT(U/L)	MDA(nmol/L)
Control group	32.13±3.45	18.49±1.87	10.87±1.52
Model group	9.24±1.36 ^a	7.23±0.41 ^a	39.26±4.36 ^a
Pterostilbene low-dose group	19.15±1.72 ^{ab}	12.15±0.82 ^{ab}	27.54±3.24 ^{ab}
Pterostilbene High-dose group	28.02±2.65 ^{abc}	16.84±1.76 ^{abc}	13.13±1.67 ^{abc}
Pterostilbene+ML385 group	10.96±1.13 ^{acd}	9.31±0.86 ^{acd}	36.49±3.85 ^{acd}
<i>F</i>	62.347	74.174	69.825
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compare with control group, ^a $P<0.05$. Compare with model group, ^b $P<0.05$. Compare with pterostilbene low-dose group, ^c $P<0.05$. Compare with pterostilbene high-dose group, ^d $P<0.05$.

2.6 紫檀芪对 NAFLD 大鼠肝组织凋亡蛋白及 Keap-1/Nrf2/HO-1 通路蛋白表达的影响

与对照组相比,模型组大鼠肝组织 Nrf2、HO-1、Bcl-2 表达水平显著降低 ($P<0.05$),Keap-1、Bax 表达水平显著升高 ($P<0.05$)。与模型组相比,紫檀芪低、高剂量组大鼠肝组织 Nrf2、HO-1、Bcl-2 表达水平均升高 ($P<0.05$),肝组织 Keap-1、Bax 表达水平均降低 ($P<0.05$);与紫檀芪低剂量组相比,紫檀芪高剂量组大鼠肝组织 Nrf2、HO-1、Bcl-2 表达水平升高 ($P<0.05$),Keap-1、Bax 表达水平降低 ($P<0.05$);与紫檀芪高剂量组相比,紫檀芪 +ML385 组大鼠肝组织 Nrf2、HO-1、Bcl-2 表达水平降低 ($P<0.05$),Keap-1 表达水平无明显变化 ($P>0.05$),Bax 表达

水平升高 ($P<0.05$)。见图 2、表 6。

3 讨论

我国 NAFLD 发病率较高,并随饮食结构和营养摄入的改变呈逐年上升趋势,目前其病理生理机制尚不完全清楚,除了对症治疗尚无公认高效的治疗方法和药物,因此探寻新型的 NAFLD 治疗药物是临床研究的热点^[12-14]。本研究通过高脂饲料饲养 SD 大鼠的方法制备 NAFLD 模型,结果显示,长时间喂养高脂饲料,可引发脂质代谢异常,升高血脂水平,并发现大鼠每单位肝组织石蜡切片面积中有超过 1/3 的肝细胞发生脂肪变性,揭示 NAFLD 模型建立成功^[15]。

研究显示,脂质类物质聚集在肝脏内引发的氧化应激和慢性炎症是造成 NAFLD 的主要元凶,进行抗炎、抗氧化干预可预防和逆转肝脂肪变性,有效延缓 NAFLD 病情进展^[16,17]。紫檀芪是一种天然抗氧化剂,可通过抑制氧化应激减弱关节软骨细胞凋亡^[18],还可降低急性梗阻性胆管炎小鼠炎症因子表达,减轻肝组织炎症损伤^[19]。本研究以不同剂量紫檀芪干预处理 NAFLD 大鼠,结果显示,可明显降低血脂,改善脂质代谢,减轻大鼠炎症及氧化应激反应,抑制其肝细胞凋亡,修复肝功能,且高剂量紫檀芪作用更强,表明紫檀芪可能通过抗炎、抗氧化活性作用改善 NAFLD 大鼠脂质代谢及肝功能,延缓 NAFLD 大鼠病情进展,揭示紫檀芪可能是 NAFLD 潜在的治疗药物^[20,21]。

Nrf2/HO-1 信号通路是调控机体氧化/抗氧化平衡的主要信号通路,在 NAFLD 发生发展过程中起到关键作用,研究显示,增强高脂饮食喂养的 NAFLD 小鼠 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达可减轻其肝脏脂肪变性,降低炎症因子表达及脂质过氧化水平,改善小鼠肝损伤^[22,23]。Keap-1 是 Nrf2/HO-1 信号通路的负调控因子,下调其表达可激活 Nrf2/HO-1 信号,增强机体抗氧化能力,减弱肝脏缺血再灌注氧化损伤^[24,25],由此可知,Keap-1/Nrf2/HO-1 信号通路可能是 NAFLD 的潜在治疗靶点。本研究结果显示,NAFLD 模型大鼠肝组织 Keap-1 表达上调,Nrf2 及 HO-1 蛋白表达下调,紫檀芪可逆转 NAFLD 大鼠上述

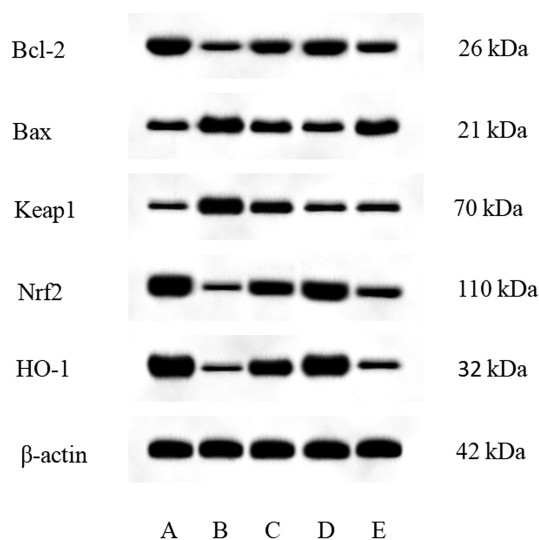


图2 免疫印迹检测各组大鼠肝组织凋亡蛋白及 Keap-1/Nrf2/HO-1 通路相关蛋白表达

Fig.2 Western blot was used to detect the expression of apoptotic proteins and Keap-1/Nrf2/HO-1 pathway-related proteins in liver tissue of rats in each group

Note: A: control group; B: model group; C: pterostilbene low-dose group; D: pterostilbene high-dose group; E: pterostilbene+ML385 group.

表6 各组大鼠肝组织凋亡蛋白及 Keap-1/Nrf2/HO-1 通路蛋白相对表达对比($\bar{x} \pm s$, n=12)

Table 6 Comparison of relative expression of apoptotic protein and Keap-1/Nrf2/HO-1 pathway protein in liver tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s$, n=12)

Groups	Bcl-2/ β -actin	Bax/ β -actin	Keap-1/ β -actin	Nrf2/ β -actin	HO-1/ β -actin
Control group	0.93 $\pm$ 0.11	0.31 $\pm$ 0.03	0.17 $\pm$ 0.04	1.24 $\pm$ 0.31	1.36 $\pm$ 0.34
Model group	0.24 $\pm$ 0.05 ^a	0.85 $\pm$ 0.12 ^a	0.98 $\pm$ 0.13 ^a	0.16 $\pm$ 0.02 ^a	0.12 $\pm$ 0.03 ^a
Pterostilbene low-dose group	0.52 $\pm$ 0.07 ^{ab}	0.61 $\pm$ 0.06 ^{ab}	0.60 $\pm$ 0.12 ^{ab}	0.69 $\pm$ 0.05 ^{ab}	0.74 $\pm$ 0.09 ^{ab}
Pterostilbene High-dose group	0.86 $\pm$ 0.14 ^{abc}	0.35 $\pm$ 0.05 ^{abc}	0.22 $\pm$ 0.06 ^{abc}	1.18 $\pm$ 0.11 ^{abc}	1.04 $\pm$ 0.28 ^{abc}
Pterostilbene+ML385 group	0.29 $\pm$ 0.06 ^{acd}	0.75 $\pm$ 0.14 ^{acd}	0.25 $\pm$ 0.05 ^{cd}	0.23 $\pm$ 0.07 ^{acd}	0.19 $\pm$ 0.05 ^{acd}
F	72.815	69.185	64.529	85.623	81.094
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compare with control group, ^a P <0.05. Compare with model group, ^b P <0.05. Compare with pterostilbene low-dose group, ^c P <0.05. Compare with pterostilbene high-dose group, ^d P <0.05.

蛋白变化趋势,表明 Keap-1/Nrf2/HO-1 信号通路可介导紫檀芪对 NAFLD 大鼠的治疗过程,以 Nrf2/HO-1 信号通路抑制剂 ML385 与紫檀芪联合干预处理 NAFLD 大鼠,可减弱紫檀芪对大鼠脂质代谢的改善作用,降低紫檀芪的抗炎、抗氧化功效,拮抗其对大鼠肝细胞凋亡的抑制作用,最终逆转紫檀芪对 NAFLD 大鼠肝功能的修复功能,揭示紫檀芪可通过激活 Keap-1/Nrf2/HO-1 信号通路抑制 NAFLD 大鼠氧化应激和肝细胞凋亡。

综上所述,本研究证实了紫檀芪可下调 Keap-1 表达,激活 Nrf2/HO-1 信号,降低大鼠血脂水平,改善其脂质代谢,抑制大鼠炎症,并增强其抗氧化能力,进而降低大鼠肝细胞凋亡率,减轻其肝功能损伤,表明紫檀芪可能通过促进 Keap-1/Nrf2/HO-1 信号传导减弱氧化应激和炎症反应,从而抑制 NAFLD 大鼠肝细胞凋亡。

参考文献(References)

- [1] Cariou B, Byrne CD, Loomba R, et al. Nonalcoholic fatty liver disease as a metabolic disease in humans: A literature review [J]. Diabetes Obes Metab, 2021, 23(5): 1069-1083
- [2] Powell EE, Wong VW, Rinella M. Non-alcoholic fatty liver disease[J]. Lancet, 2021, 397(10290): 2212-2224
- [3] Ziolkowska S, Binienda A, Jabłkowski M, et al. The interplay between insulin resistance, inflammation, oxidative stress, base excision repair and metabolic syndrome in nonalcoholic fatty liver disease [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(20): 11128
- [4] Li J, Wang T, Liu P, et al. Hesperetin ameliorates hepatic oxidative stress and inflammation via the PI3K/AKT-Nrf2-ARE pathway in oleic acid-induced HepG2 cells and a rat model of high-fat diet-induced NAFLD[J]. Food Funct, 2021, 12(9): 3898-3918
- [5] Han J, Shi X, Du Y, et al. Schisandrin C targets Keap1 and attenuates

- oxidative stress by activating Nrf2 pathway in Ang II-challenged vascular endothelium[J]. *Phytother Res*, 2019, 33(3): 779-790
- [6] Gao G, Xie Z, Li EW, et al. Dehydroabietic acid improves nonalcoholic fatty liver disease through activating the Keap1/Nrf2-ARE signaling pathway to reduce ferroptosis [J]. *J Nat Med*, 2021, 75(3): 540-552
- [7] Khalaf MM, Hassanein EHM, Shalkami AS, et al. Diallyl disulfide attenuates methotrexate-induced hepatic oxidative injury, inflammation and apoptosis and enhances its anti-tumor activity[J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2022, 15(1): 213-226
- [8] 王若利, 岳红梅, 王潇, 等. 紫檀芪治疗纤维化疾病的实验研究进展[J]. *中国新药与临床杂志*, 2021, 40(7): 494-498
- [9] 芦雅丽, 萨日娜, 魏立晓, 等. 基于 Keap1/Nrf2 信号通路研究紫檀芪对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38(17): 2079-2087
- [10] 蔡宇, 周红俐, 段文涛, 等. 绞股蓝总皂苷对非酒精性脂肪肝大鼠氧化应激及肝细胞凋亡的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(10): 1256-1259
- [11] 徐志广, 张朴花. 虎杖苷通过调控 Nrf2/HO1 信号通路减轻大鼠肝脏缺血再灌注损伤[J]. *中成药*, 2021, 43(2): 362-368
- [12] 杜凯音, 徐洪涛, 张宝和, 等. 健康查体人群非酒精性脂肪肝发病的相关危险因素分析 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(24): 4714-4718
- [13] 周宗涛, 邓利明, 胡丽君, 等. 非酒精性脂肪肝药物治疗靶点及药物研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2020, 29(12): 1363-1374
- [14] Wong WK, Chan WK. Nonalcoholic fatty liver disease: A global perspective[J]. *Clin Ther*, 2021, 43(3): 473-499
- [15] 楼琦, 石巧娟, 郭红刚, 等. 非酒精性脂肪肝大鼠脂质代谢及病理变化的动态观察[J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(3): 5-11
- [16] 石项天, 徐亚楠, 王猛, 等. 脂质因子在非酒精性脂肪肝中作用机制研究进展[J]. *中国医药导报*, 2022, 19(19): 41-44, 65
- [17] Lin Q, Huang Z, Cai G, et al. Activating adenosine monophosphate-activated protein kinase mediates fibroblast growth factor 1 protection from nonalcoholic fatty liver disease in mice[J]. *Hepatology*, 2021, 73(6): 2206-2222
- [18] 林义才, 吴正远, 罗颖丽, 等. 紫檀芪干预人软骨细胞的氧化应激性凋亡[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(32): 5092-5096
- [19] 王亚利, 余建华, 沈志宏, 等. 紫檀芪对急性梗阻性胆管炎引起肝损伤的保护作用和机制研究[J]. *全科医学临床与教育*, 2020, 18(2): 109-112
- [20] Tsai HY, Shih YY, Yeh YT, et al. Pterostilbene and Its Derivative 3'-Hydroxypterostilbene Ameliorated Nonalcoholic Fatty Liver Disease Through Synergistic Modulation of the Gut Microbiota and SIRT1/AMPK Signaling Pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(16): 4966-4980
- [21] Dellinger RW, Holmes HE, Hu-Seliger T, et al. Nicotinamide riboside and pterostilbene reduces markers of hepatic inflammation in NAFLD: A double-blind, placebo-controlled clinical trial [J]. *Hepatology*, 2023, 78(3): 863-877
- [22] Han X, Ding C, Zhang G, et al. Liraglutide ameliorates obesity-related nonalcoholic fatty liver disease by regulating Sestrin2-mediated Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 525(4): 895-901
- [23] 薛瑾, 陈应强. Nrf2/HO-1 信号通路在肝脏相关疾病中的研究进展[J]. *南昌大学学报(医学版)*, 2022, 62(3): 88-92
- [24] Hassanein EHM, Khader HF, Elmansy RA, et al. Umbelliferone alleviates hepatic ischemia/reperfusion-induced oxidative stress injury via targeting Keap-1/Nrf-2/ARE and TLR4/NF- κ B-p65 signaling pathway[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2021, 28(47): 67863-67879
- [25] El-Sherbiny M, Atef H, Helal GM, et al. Vitamin K2 (MK-7) Intercepts Keap-1/Nrf-2/HO-1 Pathway and Hinders Inflammatory/Apoptotic Signaling and Liver Aging in Naturally Aging Rat [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(11): 2150