余甘子对对乙酰氨基酚(APAP)诱发的肝损伤的保护机制研究

姚亮亮[1]，张丁[2,3]，刘家琛[2]，朱素有[1]，杨丽[1]，何军伟[1]

(1.江西中医药大学附属医院，江西中医药大学，江西南昌 330006)(2.三峡大学第一临床医学院，湖北宜昌 443003)(3.宜昌市中心人民医院，湖北宜昌 443003)

摘要：采用体外细胞实验和体内动物实验研究余甘子提取物(PLE)对对乙酰氨基酚(APAP)诱发的的肝损伤的保护效果和相关作用机制。检测了小鼠血清中的谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)水平、肝匀浆谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)水平、肝组织病理检测; Westem blot 检测核转录因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)的表达; PCR 检测 *mNqo1*、*mG6pdx*、*mSOD2* 的表达。肝细胞 HepG2 实验表明，PLE 组与 APAP 组相比，经过 PLE 处理的肝细胞可以保持较高的细胞活力及 GSH 含量，PLE 处理组 GSH 的含量也显著提高至 16.91±4.34 和 25.19±1.33 μmol/mg。动物实验表明 PLE 含量越高可以将 ALT、AST 水平降低越明显，PLE 处理组血清 ALT 和 AST 分别为 263.7±87.1 IU/L，188.4±45.9 IU/L 和 640.9±224.6 IU/L，155.9±50.6 IU/L，不仅可以降低肝细胞 MDA 表达并且可以提高 GHS 含量，并使 Nrf2 转位入核，下游相关基因 *mNqo1*、*mG6pdx*、*mSOD2* 的表达也明显上升。总之高浓度的 PLE 可以针对 APAP 引起的肝损伤对肝组织进行保护，该保护作用可能与激活抗氧化应激 Nrf2/ARE 信号通路有关。

关键词：余甘子提取物；对乙酰氨基酚；肝损伤；氧化损伤

文章篇号：1673-9078(2019)03-7-14 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.3.002

Phyllanthus emblica L. Protected Acetaminophen-induced Hepatotoxicity *via* Activating Nrf2 / ARE Signaling Pathway

YAO Liang-liang[1], ZHANG Ding[2,3], LIU Jia-chen[2], ZHU Su-you[1], YANG Li[1], HE Jun-wei[1]

(1.Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine/Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)(2.The First College of Clinical Medical Science, China Three Gorges University, Yichang 443003, China)(3.Yichang Central People's Hospital, Yichang 443003, China)

Abstract: Hepatic cells and *in vivo* mice assay were used to investigate the potential protective mechanisms of PLE (*Phyllanthus emblica* L. extracts) against acetaminophen (APAP)-induced hepatotoxicity. The levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) were detected. The contents of glutathione (GSH) and malondiadehyde (MDA) in liver tissue were measured by commercial kits. HE staining was performed to observe morphological changes of the liver. The protein expression of Nrf2 was detected by Western blotting. The mRNA expressions of *mNQO1*, *mG6pdx*, *mSOD2* was tested by quantitative real-time PCR. The results showed that in HepG2 cells, APAP exposure induced the decrease of the cell viability and GSH content, which were both greatly restored by PLE pretreatment. The content of GSH was increased to 16.91 ± 4.34 and 25.19 ± 1.33 μmol/mg, respectively by PLE treatment. Compared with the model group, the serum activities of ALT and AST as well as MDA content remarkably reversed by the administration of PLE (100 mg/kg), while GSH contents were elevated in liver tissues. The content of ALT and AST decreased to 263.7±87.1 IU/L, 188.4±45.9 IU/L and 640.9±224.6 IU/L, 155.9±50.6 IU/L, respectively. Nrf2 protein expression in the liver tissue as well as mRNA expressions of *mNQO1, mG6pdx, mSOD2* increased. High-dose PLE can inhibit APAP-induced hepatotoxicity, and the mechanism might be associated with the activation of Nrf2 /ARE signaling pathway.

收稿日期：2018-11-16

基金项目：江西中医药大学重点学科支持青年教师培养计划项目(2017JZZDXK004)；江西省卫生计生委科技计划项目(20185321)；江西省教育厅科技计划项目资助(GJJ180694)

作者简介：姚亮亮（1986-)，女，讲师，硕士，研究方向：药理学

通讯作者：杨丽（1986-)，女，讲师，硕士，研究方向：中药药效物质基础及质量标准研究

Key words: *Phyllanthus emblica* L. extracts; acetaminophen; hepatotoxicity; oxidative stress

余甘子，又名余甘树、油甘子、庵摩勒、橄榄、滇橄榄、园酸角、油柑、望果、牛甘子和麻项邦等，是大戟科叶下珠属木本植物，为常用清热解毒药[1]。对乙酰氨基酚（APAP）是临床广泛应用解热镇痛类非处方药，又称扑热息痛，在安全剂量的前提下服用 APAP 具有明显疗效，但是患者一旦长期或者大量服用 APAP 可诱发严重的急性肝损伤，最终发展为肝功能衰竭并可能导致患者死亡[2]。据报道，在美国每年因过量服用 APAP，约 2600 人住院治疗，56000 人就诊于急诊室并有 500 人死亡。在我国因人口基数、医疗条件、医学知识的因素，导致了国内有大量人群因服用高剂量的 APAP 的病例。民众大量使用 APAP 导致肝损伤成为国内严重的医疗卫生问题[3]。现如今引起肝损伤的发病机制尚未阐述清楚。在人体内，造成肝损伤的主要途径是 APAP 消耗肝内的谷胱甘肽（glutathione，GHS）引起细胞氧化应激而造成肝损伤[4]。高剂量的 APAP 在细胞色素 P_{450} 酶系统的氧化作用下生成 N-乙酰-P-苯丙醌亚胺（NAPQI），NAPQI 是一种高毒性代谢产物，可以大量结合谷胱甘肽使其耗尽后与肝细胞内蛋白质结合形成蛋白质结合物，引起细胞内氧化应激，线粒体损伤和 DNA 损伤，最终导致肝坏死[5]。E2 相关因子 2（nuclear factor erythroid 2-related factor，Nrf2）在细胞氧化应激的过程中是重要的转录因子之一，与相应的抗氧化应答元件（antioxidant response element，ARE）结合可调控抗氧化，药物代谢的相关表达。在激活 Nrf2/ARE 通路，促使细胞能够增强清楚活性氧自由基的能力，所以 Nrf2/ARE 通路在氧化性损伤起到了重要的作用[6]。

余甘子具有广泛的药理活性[7]，包括降血脂、抗动脉粥样硬化、抗氧化、减肥、抗衰老、抗肿瘤、抗菌、抗炎、降血糖和降血压等。余甘子提取物（PLE）的活性成分是多酚和黄酮类化合物[8,9]。余甘子中黄酮和多酚类化合物具有很好抗氧化活性及保护肝损伤，使肝脏在氧化应激和病理炎症的作用下避免受到伤害[10~13]。余甘子提取物是否能够通过抗氧化应激对大量 APAP 引起的肝损伤有保护效果未见相关研究，本研究旨在研究余甘子提取物对预防 APAP 引起的肝损伤的保护效果，并且观察在使用余甘子是否激活了 Nrf2/APE 信号通路，为新药物治疗由 APAP 引起的肝性损伤提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

余甘子提取物（提取比例 10:1 棕黄色粉末），西安小草植物科技有限公司；对乙酰氨基酚（纯度≥98%）、MTT，美国 Sigma-AIdrich 公司；RNA 逆转录酶，中国 Toyobo 公司；Trizol 试剂，Invitrogen 公司；ALT、AST、MDA 和 GSH 试剂盒，中国南京建成生物工程有限公司；HE 染液，上海碧云天生物技术有限公司提供；多克隆兔抗 Nrf2 抗体（1:1500）和兔抗 β-actin 抗体（1:8000），美国 Pierce 公司；医用 X 射线胶片，锐珂（厦门）医疗器材有限公司；引物序列由生工生物科技公司设计合成；其他试剂为分析纯。

1.2 仪器

分析天平，北京赛多斯仪器系统有限公司；全波长酶标仪，Thermo Electoron 公司；核酸检测仪，Thermo Scientfic 公司；高速冷冻离心机，Sigma 公司；光学显微镜，Olympus 公司；SZ-93A 自动双重纯水蒸馏器，上海亚荣生化仪器厂；CO_2 培养箱，Shellab 公司；超净工作台，苏州苏云净化设备有限公司；水平摇床和 DYY-6C 型电泳仪，北京市六一仪器厂；PCR 扩增仪，ABI 公司；Real Time PCR 仪，Whatman Biomeyra 公司；TP1020 型脱水机、ULTRACUTR 型超薄切片机、石蜡包埋机、图像分析仪，Leica 公司；CS-V1 型摊片烤片机，孝感市宏业医用仪器有限公司。

1.3 实验动物的预处理、分组及处理

参考文献[14,15]的方法，雄性 C57BL/6J 小鼠，5~8 周龄，体质量 18~22 g，小鼠在三峡大学实验动物中心动物房中（SPF 级）随机分笼全天不间断饲养，温度 20~22 ℃；相对湿度为 30%~40%，小鼠饮水和饮食由三峡大学实验动物中心提供，实验动物护理和使用经中国三峡大学实验动物管理委员会批准（许可证编号：2017100I），饲养 7 d 后随机分为 4 组进行实验。将余甘子提取物与二甲亚砜溶液（2%，0.9%氯化钠）配制成 1 mg/mL 的溶液，然后将 APAP 溶解在其中充分混匀后配制为 300 mg/kg 的溶液将购买的 20 只 SPF 级 C57BL/6J 小鼠进行适应性饲养一周，将其随机分为 4 组，对照组，APAP 组，PLE 50 mg/kg 组、PLE 100 mg/kg 组每组 5 只小鼠，对照组和 APAP 组灌胃给与 PLE 等量生理盐水其余 PLE 组进行灌胃给药，分别每天灌胃一次连续一周。在第 6 d 时 APAP 组和不同浓

度的 PLE 组进行腹腔注射溶解了 300 mg/ml APAP 的氯化钠注射液，对照组则进行腹腔注射等量的氯化钠注射液。全部给药完毕后 24 h 后对小鼠采用眼球取血，在 25 ℃下凝结 1 小时后在 4 ℃离心机下（3500 r/min，20 min）离心。离心完毕后取上清液用微板法进行 ALT、AST 肝功能活性水平的测定，使用南京建成生物有限公司的提供的说明书。再取相同肝叶的肝脏组织放入多聚甲醛中固定后，做肝组织切片进行显微观察肝脏的病理变化。将其他部分的肝脏放入-80 ℃冰箱。从取得冷冻的肝脏组织溶于 0.9%的氯化钠溶液制备肝匀浆，取上清液采用二硫代硝基苯和硫代巴比妥法试剂盒按照说明书进行实验操作测定 GSH 和 MDA 的含量。

1.4 细胞培养及处理

参考文献[14,15]的方法，由上海中科院提供人肝细胞 HepG2，细胞用含有 DMEM（含有 10%的 PBS）培养基培养，在 5% CO_2 37 ℃的培养箱中恒温培养。实验分为空白对照组和不同浓度梯度的余甘子提取物的无血清培养基代替就培养基（25，50 μg/mL）8 h 加入 5 mM APAP 在 37 ℃下孵育 24 h，使用 PBS 缓冲溶液洗涤两次后进行细胞活力测定和 GSH 分析。在进行 GSH 分析时以南京建成生物有限公司提供的 GSH 定量试剂盒测量 GSH 含量。细胞活力的测定采用 MTT 法。在微板孔内加入 20 μL MTT 溶液后培养 4 h 倒掉内培养液终止培养，在原有基础上加入二甲亚砜每孔 150 μL 后放在脱色摇床缓慢摇匀 15 min，使微板内结晶体溶解后，用酶标仪 $OD_{490\ nm}$ 处测量每个孔的吸光度反复进行三次后，计算细胞存活率，使用 Grahpad Prism 5 软件进行分析处理，从吸光强度可以直接反映出细胞活性和数量。

1.5 HE 染色检测肝组织病变

参考文献[16]的方法，将取下的肝组织浸泡于 4%多聚甲醛过夜，经过脱水后包埋到蜡片中，进行组织切片以 HE 染色步骤染色，用中性树胶对切片封片，在光镜下以不同的视野在相同的设置下观察肝组织的病理学改变并随机拍照取图。

1.6 Western Blot 印记法检测 Nrf2 蛋白的表达

参考文献[17]的方法，将 0.2 g 冷冻的肝脏组织放入 1.5 mL EP 管中并加入 RIPA 裂解液制备肝脏裂解物，匀浆后离心取管内的的上清液测定蛋白浓度，使用 BCA 试剂盒测定。利用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白，用湿转法将蛋白质转移到 PVDF 膜上，用脱脂奶粉封闭 1 h，封膜后加入一抗在 4 ℃冰箱内脱色摇床上过夜，第二天在室温下孵育二抗 1 h，在曝光室显影，使用胶片定影，使用 Image-Pro 6.0 灰度扫描胶片并使用 Graphpad Prism 5 软件分析处理。

1.7 RT-PCR 法检测基因表达变化

参考文献[14,15]的方法，检测小鼠肝脏 *mNqo1*、*mG6pdx*、*mSOD2* mRNA 的表达情况。首先使用 Trizol 法提取 RNA，核酸检测仪测定 RNA 的浓度和纯度在进行逆转录得到 cDNA。其具体的引物信息：*mNqo1* 上游引物序列：5’-GGGACATGAACGTCATTCTCTG-3’，下游引物序列 5’ -GGTCTCCTCCCAGACGGTTT-3’G6pdx；上游引物序列 5’-GCTGCACAAGATTGATCGAGAA-3’，下游引物序 5’-GGTACCCTCGTACTGGAAGCC-3’；*mSOD2* 上游引物序列 5’-GCAAGGTCGCTTACAGATTGC-3’，下游引物序列 5’-GCTTTCAGATAGTCAGGTCTGACG-3’；*18S rRNA* 上游引物序列为 5’-GGTCATAAGCTTGCGTT GATTAAG-3’，下游引物为 5’-CTACGGAAACCTTGTTACGACTTT-3。扩增体系为 20 μL，配置 96 孔板封条离心放在 ABI PRISMx 7000 荧光定量 PCR 仪进行 Real-Time PCR，18S rRNA 为内参基因，精确定量目的基因的 mRNA 表达水平。

1.8 统计学方法

实验在细胞活力，细胞数量及生长水平均采用 Graphpad Prism 5 软件分析和 Image-Pro Plus 扫描软件处理并进行数据处理。所得出的实验结果均采用（x±s）形式表示，各组均数之间比较用单因素方差分析，$p<0.05$ 差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 余甘子提取物对 HepG 2 细胞活力和 GSH 的影响

谷胱甘肽由谷氨酸，半胱氨酸和甘氨酸三种氨基酸脱水缩合形成，是一种含有巯基的三肽，它广泛存在于肝脏内，因为谷胱甘肽有整个解毒作用，参与生物转化，把体内的有害物质转化为无害物质，所以它是肝脏发挥代谢的功能的重要物质。余甘子提取物对 HepG 2 细胞活力和 GSH 的影响见图 1，正常组与对照组相比，APAP 组的 HepG2 细胞活力明显下降，与其相比 PLE 组的 HepG2 的细胞活力有显著的增高（**，$p<0.01$），从实验数据来看，正常组较 APAP 组

HepG2 细胞 GSH 的含量明显降低 4.02±0.97 μmol/mg（***，p<0.001）。与 APAP 组相比较，PLE 组的 HepG2 细胞 GSH 的含量也显著提高至 16.91±4.34 和 25.19±1.33 μmol/mg（##，p<0.01），因此 PLE 可以通过保护自由基细胞免受 APAP 诱导的肝毒性来保护 APAP 诱发的 HepG2 细胞肝损伤。

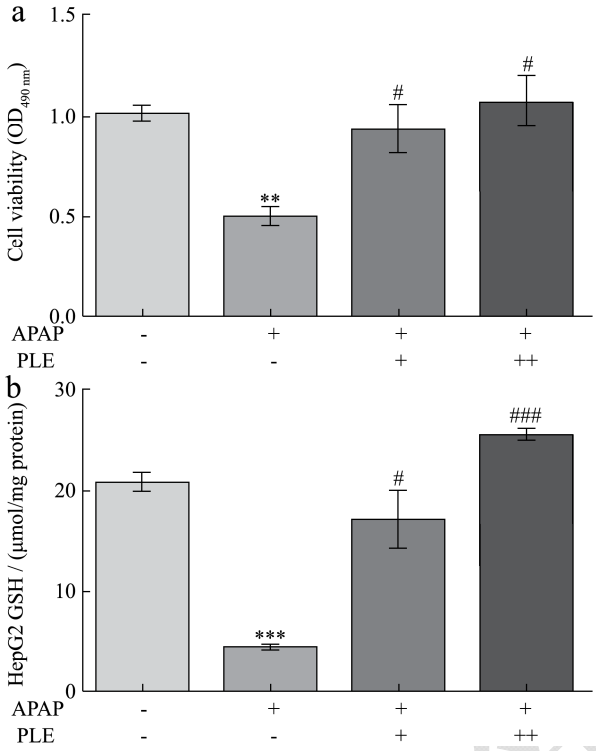

图 1 不同浓度的余甘子提取物(25、50 μg/mL)对 APAP 致 HepG2 细胞活力(a)及 GSH 含量(b)的影响

Fig.1 Effects of PLE with different concentrations (25, 50 g/mL) on HepG2 cell viability (a) and GSH content (b) induced by APAP

注：**p <0.01，***p <0.001 *vs* Control；#p <0.05，###p <0.001 *vs* Model。

2.2 余甘子提取物对小鼠血清指标的影响

血清生化检测是检测肝功能的主要系统指标，在所检测的所有指标中能够体现肝脏损伤的重要指标是 AST、ALT 的生物活性的高低，当 APAP 损伤肝脏细胞时 AST 和 ALT 从肝脏转移至血液中，以至于 AST 和 ALT 患者血清中显著升高。在生理常态下 ALT 和 AST 只存在于肝细胞的胞浆中，但是高剂量的 APAP 会引起肝损伤使免疫细胞发挥作用导致肝细胞破裂使 ALT、AST 转移至细胞外间隙，所以实验测定 ALT 和 AST 是对肝细胞损伤程度的直观有效的反映。与正常对照组比较，APAP 组血清中 ALT 和 AST 水平显著升高至 1387.6±129.7 IU/L 和 2246.1±98.3 IU/L(***，p<0.001)，表明小鼠急性肝损伤模型制备成功；PLE 50 mg/kg 和 PLE 100 mg/kg 组的血清 ALT 和 AST 水平明显低于 APAP 组，分别为 263.7±87.1 IU/L，188.4±45.9 IU/L 和 640.9±224.6 IU/L，155.9±50.6 IU/L(###，p<0.001)，存在剂量效应关系。实验数据表明高剂量得 PLE 可以有效降低急性肝损伤所引起得转氨酶含量以及活性，说明 PLE 具有防止肝脏受到损伤的护肝作用。

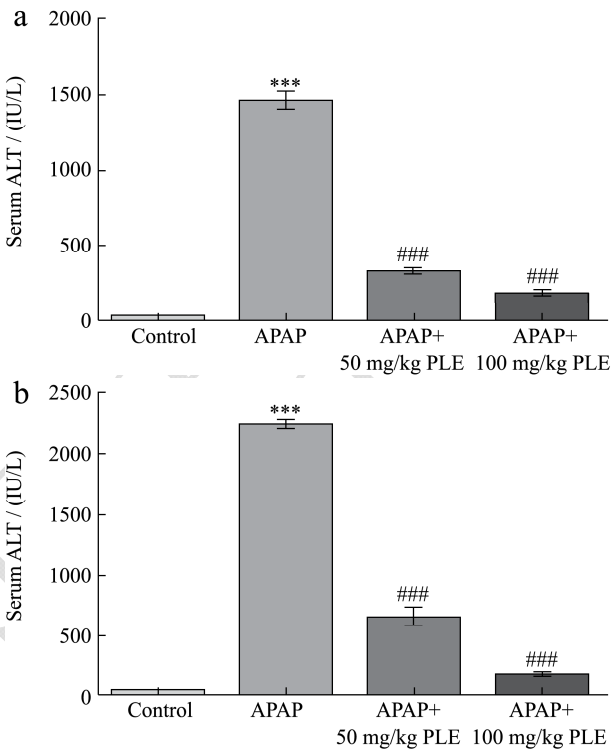

图 2 余甘子提取物对 APAP 致急性肝损伤小鼠血清中 ALT(a)和 AST(b)水平的影响

Fig.2 Effects of PLE on serum ALT (a) and AST (b) levels of acute liver-injury mice induced by APAP

注：***p <0.001 *vs* Control；###p <0.001 *vs* Model。

2.3 余甘子提取物对小鼠肝脏中 GSH 和 MDA 的影响

在 APAP 过量时，大量的 NAPQI 产生会耗尽肝脏中主要产生的 GSH，当 GSH 消耗殆尽时肝脏失去清除自由基作用，肝脏新陈代谢受到影响。所以 GSH 的含量直接反映了自由基损耗细胞的程度。MDA 是一种膜脂过氧化物的产物，通过测定 MDA 的含量可以了解膜脂过氧化程度，可以间接测定膜系统受损程度。APAP 组小鼠与正常组小鼠肝组织匀浆 GSH 含量明显降低 5.40±0.95 μmol/mg（***，p<0.001），通过 PLE 组小鼠的肝组织匀浆测定，GSH 的含量较 APAP 组 GSH 含量有所提高，经过计算 PLE 100 mg/kg 升高 GSH 含量 10.13±1.63 μmol/mg（##，p<0.01）。APAP

组 MDA 含量对比正常组明显含量明显升高至 2.53±0.17 nmol/mg（***，p<0.001），PLE 50 mg/kg 和 PLE 100 mg/kg 两组的 MDA 含量对比 APAP 组的 GSH 含量有明显降低，PLE 50 mg/mL 组降低下降 1.08±0.17 nmol/mg；PLE 100 mg/kg 组降低了 0.61±0.16 nmol/mg（###，p<0.001）。从实验数据上来看，PLE 可以提高 GSH 含量，促进肝细胞的抗氧化能力，减少肝细胞膜脂的过氧化。

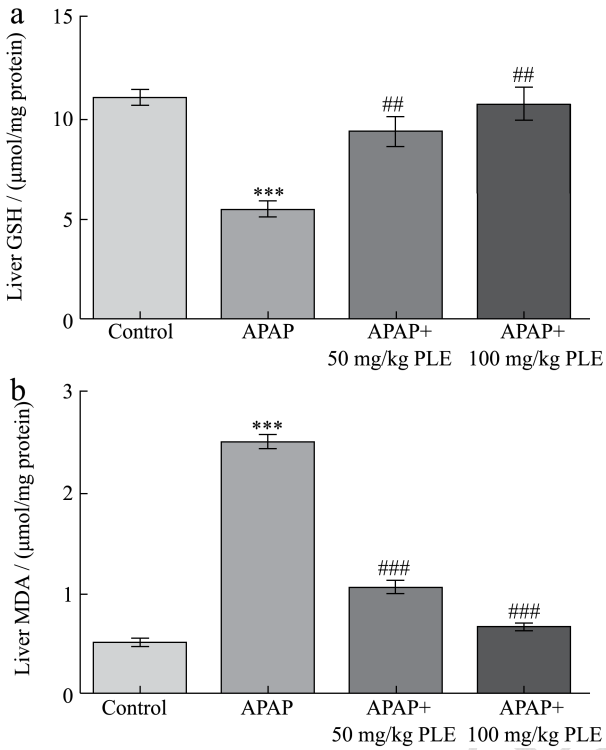

图 3 余甘子提取物对 APAP 致急性肝损伤小鼠肝匀浆中 GSH(a)和 MDA(b)水平的影响

Fig.3 Effects of PLE on Liver GSH (a) and MDA (b) levels of acute liver-injury mice induced by APAP

注: ***p <0.001 *vs* Control; ##p <0.01, ###p <0.001 *vs* Model。

2.4 余甘子提取物对小鼠肝组织病理变化影响

肝组织的病理学检查同样是肝损伤诊断的有效手段，对于肝损伤有鉴别诊断及早期准确的评估肝损伤至关重要。在实验中可以直接观察到不同小鼠的肝脏的组织形态，空白对照组小鼠经解剖后可观察到肝脏大小形态正常，呈暗红色，组织富有弹性且有紧致感，实验组中小鼠经解剖后肝脏组织呈现红褐色甚至伴有肝脏充血膨大，也可见肝脏表面有白色颗粒。从实验组比较来看，加入余甘子提取物组的小鼠肝脏较 APAP 组肝损伤的组织形态有所改善，随着余甘子提取物的浓度增加肝损伤的症状减轻的更明显。光镜下观察不同浓度梯度 PLE 组病理切片。空白对照组小鼠肝脏肝细胞在肝脏中央静脉形成的肝板凹凸不平，大致呈放射状，肝小叶呈多角棱柱体，结构清晰未见有病理改变；APAP 组肝小叶结构改变明显，局部肝细胞肿大，小叶内部和汇管区有大量的炎细胞侵润，肝细胞坏死。肝细胞增殖修复现象变多；PLE 50 mg/kg 组细胞坏死减轻，肝小叶结构有所改善，炎细胞侵润也有所减轻；PLE 100 mg/mL 肝小叶结构基本正常，汇管区及汇管区周围炎细胞侵润显著减少。从肝细胞损伤面积来看，与对照组相比，APAP 组损伤面积高达 32.9±4.86%（***，p <0.001），与 APAP 组相比，PLE 50 mg/kg 和 100 mg/kg 组肝细胞损伤面积明显降低 9.6±3.73%和 3.1±2.37%（###，p<0.001）。所以 PLE 组明显缓解肝组织损伤均有一定的作用。

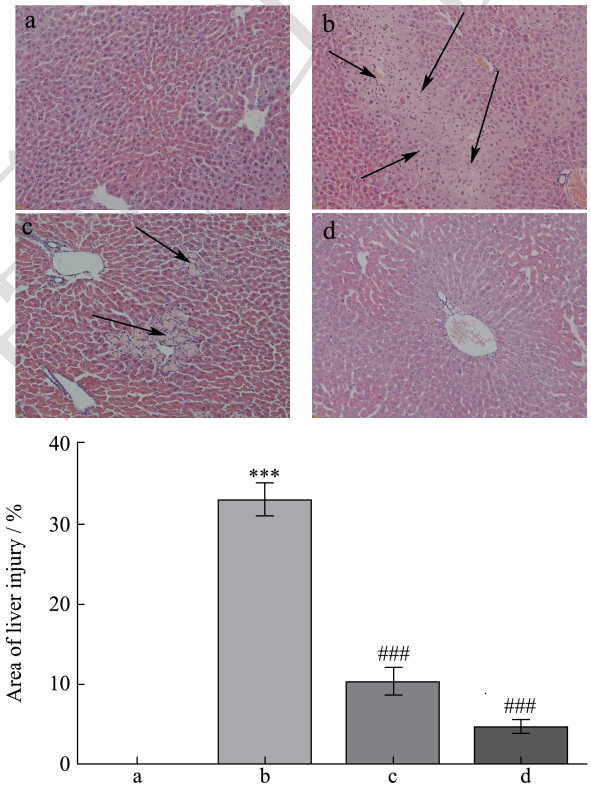

图 4 余甘子提取物对 APAP 致急性肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响

Fig.4 Effects of PLE on liver tissue pathological changes of acute liver-injury mice induced by APAP (×200)

注：a：正常对照组；b：APAP 急性肝损伤模型组；c：余甘子提取物低剂量组；d：余甘子提取物高剂量组。黑色箭头指示的是损伤部位。***p <0.001 *vs* Control; ###p <0.001 *vs* Model。

2.5 余甘子提取物对小鼠肝组织 Nrf2 蛋白表达的影响

外源性化合物进入体内经过代谢生物转化形成活

性代谢物引起机体氧化应激，而核因子 Nrf2 是细胞防御这些氧化应激的重要调节因子。Nrf2 通过与 ARE 相互作用调节抗氧化蛋白，对细胞的毒性损伤起到了保护作用。在正常生理状态下，Nrf2 与 keap1 的紧密结合，使 Nrf2 只能相对 Keap1 的自由移动，无法进入胞核发挥生理功能，当氧化应激的条件下产生了大量的自由基，Keap1 蛋白构象发生改变从而使 Nrf2 解离，进入细胞核与 Maf 蛋白结合后与 ARE 结合，使靶基因表达，激活 SOD2、NQO1、G6pdx 表达后发挥抗氧化损伤作用。通过 Western blot 法检测各组小鼠肝脏 Nrf2 蛋白的表达，结果表明 APAP 组 Nrf2 表达增加是空白对照组的 2.41 倍（***，p<0.001）与 APAP 组组相比，而 PLE 低剂量、高剂量组（50，100 mg/kg）细胞内 Nrf2 表达水平显著升高至 3.32 与 4.16 倍，差异有统计学意义(#，p <0.05)。

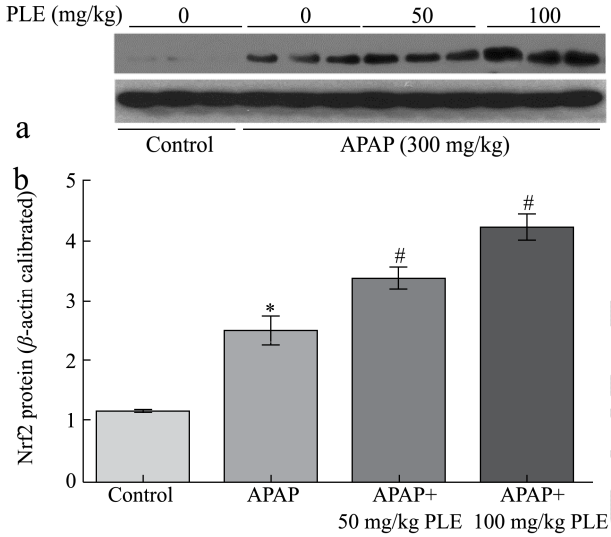

图 5 余甘子提取物对 APAP 致急性肝损伤小鼠肝组织中 Nrf2 蛋白表达的影响

Fig.5 Effects of PLE on protein expression of Nrf2 in liver of acute liver-injury mice induced by APAP

注：*p <0.05 *vs* Control; #p <0.05 *vs* Model。

2.6 余甘子提取物对小鼠肝组织 *mNQO1*、*mG6pdX*、*mSOD2* mRNA 水平的影响

APAP 诱发急性肝损伤重要的发病机制是氧化应激，在肝细胞中氧自由基对 APAP 引起的急性肝损伤的发生有着重要的作用。研究显示 mNQO1，mG6pdX，mSOD2 都为 Nrf2 的下游产物，当引起小鼠的肝损伤时，mNQO1，mG6pdX，mSOD2mRNA 的表达增加，并且与 Nrf2 呈正相关性。实时定量 PCR 结果显示，正常对照组，APAP 组，PLE 低剂量组，PLE 高剂量组 *NQO1*、*G6pdX*、*SOD2* 的表达依次升高，并且具有差异有统计学意义(#，p<0.05)。这些结果证明了余甘子提取物可以增强 Nrf2 通路的表达，提高肝细胞的抗氧化性。

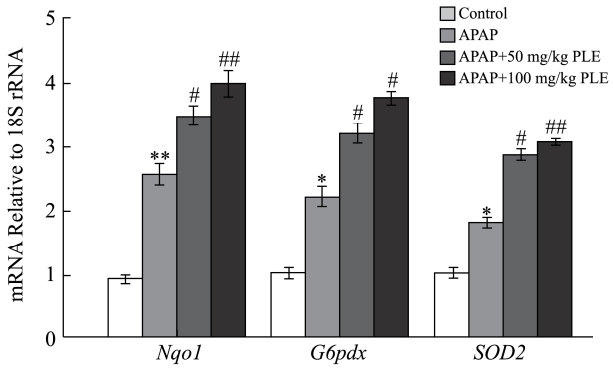

图 6 余甘子提取物对 APAP 致急性肝损伤小鼠肝组织中 *mNQO1*、*mG6pdX*、*mSOD2* mRNA 表达的影响

Fig.6 Effects of PLE on mRNA expression of *mNQO1*、*mG6pdX*、*mSOD2* in liver of acute liver-injury mice induced by APAP

注：*p <0.05，**p <0.01 *vs* Control；#p <0.05，##p <0.01 *vs* Model。

3 讨论

急性肝损伤是对肝脏疾病发生，发展以及最后导致肝功能衰竭的主要原因，现阶段对肝损伤完整的治疗仍然是困扰全球的问题，建立 APAP 诱发小鼠急性肝损伤模型是研究药物护肝活性的经典方法，为了更加深入的研究急性肝损伤发生机制，探究新的安全高效药物奠定基础[18]。余甘子提取物是多酚和黄酮类化合物为主的活性成分，具有抗活性氧自由基、抗感染、抗炎症、抗过敏和抗肿瘤等多种药理活性[19]。研究发现 PLE 可以降低肝癌 HepG2 细胞活力，促进细胞凋亡，促使肝癌细胞的生长阻滞。PLE 通过抗氧化应激，下调 NF-κB 信号传导、减少炎症介质，对内毒素引起的小鼠急性肝衰竭具有保护作用[19~21]。本研究表明，通过实验证明 PLE 在生命体内体外明显减缓 APAP 诱导的肝损伤、肝中毒，表明余甘子提取物对肝细胞的损伤具有保护作用[22,23]。

CYP2E1 的表达水平是 APAP 诱发肝损伤的重要因素[24]。APAP 诱发的肝细胞损伤主要由于其代谢产物 NAPQI(N-乙酰-P-苯丙醌亚胺)产生的，CYP2E1 把 APAP 催化氧化代谢成 NAPQI[25]，使肝细胞产生了大量的自由基，自由基影响细胞脂质过氧化，影响到线粒体的生理活动干扰细胞中钙离子平衡，导致肝细胞死亡从而使肝功能衰竭[5]。余甘子可以降低 D-半乳糖胺(D-Gal-N)导致的肝损伤血清 ALT、AST、ALP、MDA 含量和肝脏系数，提高血清 SOD 活性及促进肝

糖元合成，并可改善肝脏组织病理损伤[26]；余甘子水提醇沉物对扑热息痛(AAP)、硫代乙酰胺(TAA)所致的急性肝损伤也具有预防作用[27]；余甘子还可改善非酒精性脂肪肝形成过程中肝脏的损伤和炎症的发生[28]。我们的研究表明余甘子提取物提高肝细胞的 GSH 含量，并且降低血液中 AST 和 ALT 的水平，减少 MDA 的生成，通过 HE 染色小鼠肝组织的观察结果表明，在 APAP 组的对照下，余甘子提取物抑制了小鼠肝脏的坏死，保护小鼠肝脏结构完整性和生理活性，降低了药物对肝脏的伤害，同时余甘子提取物富含多酚类化合物，具有抑制氧化自由基生成，降低脂质的氧化，促进抗氧化酶的生成，提高其生理活性[19]。

4 结论

余甘子提取物可以有效地消除体内的氧自由基和过氧脂质，减轻 APAP 引起的急性肝损伤，抑制小鼠肝损伤的发生与发展，提高肝组织内的谷胱甘肽的含量，上调 Nrf2/ARE 信号通路，诱导下游靶基因 *mNQO1*、*mG6pdx*、*mSOD2* 的表达，降低 ROS，增强 APAP 引起的肝损伤的保护作用。

参考文献

[1] 杨顺楷,杨亚力,杨维力.余甘子资源植物的研究与开发进展[J].应用与环境生物学报,2008,14(6):846-854
YANG Shun-kai, YANG Ya-li, YANG Wei-li. Advances in research and development of *Phyllanthus emblica* L. [J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2008, 14(6): 846-854

[2] Imaeda A B, Watanabe A, Sohail M A. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2009, 119(2): 305-314

[3] 沈弢,黄昕,王誉雅,等.我国药物性肝损伤流行病学研究现状[J].临床肝胆病杂志,2018,34(6):1152-1155
SHEN Tao, HUANG Xin, WANG Yu-ya, et al. Current status of epidemiological studies on drug-induced liver injury in China [J]. Clin Hepatol, 2018, 34(6): 1152-1155

[4] Kanno Si, Tomizawa A, Yomogida S. Glutathione peroxidase 3 is a protective factor against acetaminophen induced hepatotoxicity *in vivo* and *in vitro* [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2017, 40(3): 748-754

[5] Walker V, Mills Ga, Anderson Me. The acetaminophen metabolite N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) inhibits glutathione synthetase *in vitro*; a clue to the mechanism of 5-oxoprolinuric acidosis [J]. Xenobiotica, 2017, 47(2): 164-175

[6] Chan K, Han Xd, Kan Yw. An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: Detoxification of acetaminophen [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98(8): 4611-4616

[7] LIU X, ZHAO M, WANG J. Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2008, 21(3): 219-228

[8] 刘伟,李明玺,王俊龙,等.余甘子酚类成分及其抑制 α-葡萄糖苷酶活性的研究[J].现代食品科技,2017,33(12):50-55
LIU Wei, LI Ming-xi, WANG Jun-long, et al. Structural identification of phenolic constituents from *Phyllanthus emblica* L. and their inhibitory activity on α-glucosidase [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(12): 50-55

[9] 李明玺,黄卫锋,姚亮亮,等.余甘子提取物降血糖活性及其主要成分研究[J].现代食品科技,2017,33(9):96-101
LI Ming-xi, HUANG Wei-feng, YAO Liang-liang, et al. Hypoglycemic activity of *Phyllanthus emblica* L extracts and analysis of its main components [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(9): 96-101

[10] LU CC, YANG S H, HSIA SM. Inhibitory effects of *Phyllanthus emblica* L. on hepatic steatosis and liver fibrosis *in vitro* [J]. Journal of Functional Foods, 2016, 20: 20-30

[11] Tung Y T, Huang C Z, Lin J H. Effect of *Phyllanthus emblica* L. fruit on methionine and choline-deficiency diet-induced nonalcoholic steatohepatitis [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2018, 26(4): 1245-1252

[12] Huang C Z, Tung Y T, Hsia S M. The hepatoprotective effect of *Phyllanthus emblica* L. fruit on high fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in SD rats [J]. Food & Function, 2017, 8(2): 842-850

[13] Chaphalkar R, Apte K G, Talekar Y. Antioxidants of *Phyllanthus emblica* L. bark extract provide hepatoprotection against ethanol-induced hepatic damage: A comparison with silymarin [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017, 3876040

[14] JIN F, WAN C, LI W, et al. Formononetin protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity through enhanced NRF2 activity [J]. Plos One, 2017, 12(2): e0170900

[15] 刘星,李晓娜,刘翠玲,等.香叶木素保护对乙酰氨基酚诱发的急性肝损伤[J].现代食品科技,2018,34(10):8-14
LIU Xing, LI Xiao-na, LIU Cui-ling, et al. Diosmetin ameliorated acetaminophen-induced hepatotoxicity *via* activating Nrf2 /ARE signaling pathway [J]. Modern Food

Science and Technology, 2018, 34(10): 8-14

[16] WAN C, JIN F, DU Y, et al. Genistein improves schistosomiasis liver granuloma and fibrosis *via* dampening NF-kB signaling in mice [J]. Parasitology Research, 2017, 116(4): 1165-1174

[17] PANG C, ZHENG Z, SHI L, et al. Caffeic acid prevents acetaminophen-induced liver injury by activating the Keap1-Nrf2 antioxidative defense system [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2016, 91: 236-246

[18] Mitchell J R, Jollow D J, Potter W Z. Acetaminophen-induced hepatic necrosis protective role of glutathione [J]. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1973, 187(1): 211-217

[19] NISAR M, HE J, AHMED A, et al. Chemical components and biological activities of the genus *Phyllanthus*: A review of the recent literature [J]. Molecules, 2018, 23(10): 2567

[20] Dang G K, Pareka R R R, Kamat S K. Antiinflammatory activity of *Phyllanthus emblica*, *Plumbago zeylanica* and *Cyperus rotundus* in acute models of inflammation [J]. Phytotherapy Research, 2011, 25(6): 904-908

[21] Kiemer A K, Hartung T, Huber C. *Phyllanthus amarus* has anti-inflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines *via* the NF-κB pathway [J]. Journal of Hepatology, 2003, 38(3): 289-297

[22] Abbas N, Naz M, Alyousef L, et al. Comparative study of hepatoprotective effect produced by Cuminum cyminum, fruits of *Phyllanthus emblicus* and silymarin against cisplatin-induced hepatotoxicity [J]. Int. J. Pharm. Sci. Res. 2017, 8, 2026-2032

[23] Chaphalkar R, Apte K G, Talekar Y, et al. Antioxidants of *Phyllanthus emblica* L. bark extract provide hepatoprotection against ethanol-induced hepatic damage: A comparison with silymarin [J]. Oxid. Med. Cell. Longev. 2017, 2017, 3876040

[24] Knockaert L, Descatoire V, Vadrot N. Mitochondrial CYP2E1 is sufficient to mediate oxidative stress and cytotoxicity induced by ethanol and acetaminophen [J]. Toxicol *In Vitro*, 2011, 25(2): 475-484

[25] Guggenheimer J, Moore P A. The therapeutic applications of and risks associated with acetaminophen use: A review and update [J]. J Am Dent Assoc., 2011, 142(1): 38-44

[26] 李萍,谢金鲜,林启云.余甘子对 D-半乳糖胺致小鼠急性肝损伤的影响[J].云南中医中药杂志,2003,24(1):31-33
LI Ping, XIE Jin-xian, LIN Qi-yun. Effect of *Phyllanthus emblica* L. on acute liver injury induced by D-galactosamine in mice [J]. Yunnan Journal of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, 2003, 24(1): 31-33

[27] 李萍,林启云,谢金鲜,等.余甘子护肝作用的实验研究[J].中医药学刊,2003,21(9):1589-1590
LI Ping, LIN Qi-yun, XIE Jin-xian, et al. Hepatic protection by *Phyllanthus emblica* L [J]. Study Journal of Traditional Chinese Medicine, 2003, 21(9): 1589-1590

[28] 朱炜,俞宏斌,戴闯,等.余甘子对大鼠非酒精性脂肪肝疾病中肝损伤和炎症的抑制作用研究[J].医学研究杂志,2012, 41(2):140-143
ZHU Wei, YU Hong-bin, DAI Chuang, et al. Amelioration of hepatic injury and inflammation in rat non-alcoholic fatty liver disease model by *Phyllanthus emblica* [J]. Journal of Medical Research, 2012, 41(2): 140-143

（上接第 248 页）

[23] 李双.牡丹花精油的提取、分析及抗氧化性研究[D].济南:齐鲁工业大学,2015
LI Shuang. The extraction, analysis and antioxidant research in *Peony* essential Oil [D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2015

[24] 饶建平,王文成,张远志,等.水蒸气蒸馏法提取柚子花精油工艺研究及其成分分析[J].食品工业科技,2017, 38(4):278-282,299
RAO Jian-ping, WANG Wen-cheng, ZHANG Yuan-zhi, et al. Study on the extracting process of essential oil from *Citrus maxima* flower by steam distillationand the analysis for the composition of the essential oil [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(4): 278-282, 299

[25] 丁成斌,熊光同,王强.毛叶蔷薇花净油化学成分的研究[J].香料香精化妆品,1991,1:1-4
DING Cheng-bin, XIONG Guang-tong, WANG Qiang. Study on chemical compounds of the aromatic from petals of *Rosa mairei* Levl [J]. Essential Spices Cosmetics, 1991, 1: 1-4