

[文章编号] 1671-587X(2025)01-0105-10

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250113

片仔癀在对乙酰氨基酚所致肝损伤中的保护作用及其机制

张潮鹤¹, 张昕玮*, 王相峰²

(1. 吉林大学第二医院肿瘤血液科, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学第一医院乐群院区药学部, 吉林 长春 130031)

[摘要] **目的:** 探讨片仔癀(PZH)对对乙酰氨基酚(APAP)引起的肝损伤的保护作用, 并阐明其可能的作用机制。**方法:** 将人正常肝细胞(L02细胞)分为对照组、APAP组(10 mmol·L⁻¹ APAP)、APAP+PZH组(10 mmol·L⁻¹ APAP和0.4 g·L⁻¹ PZH)和PZH组(0.4 g·L⁻¹ PZH)。采用噻唑蓝(MTT)法检测各组细胞存活率, 倒置显微镜观察各组肝细胞形态表现, 流式细胞术检测各组肝细胞凋亡率, 生化试剂盒检测各组细胞上清液中超氧化物歧化酶(SOD)和乳酸脱氢酶(LDH)活性及脂质过氧化物(MDA)水平, 荧光探针技术检测各组肝细胞中活性氧(ROS)水平和线粒体膜电位(MMP), Western blotting法检测各组细胞中凋亡相关蛋白、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)信号通路蛋白、核因子κB(NF-κB)信号通路蛋白和炎症因子的蛋白表达水平。**结果:** MTT法, 与对照组比较, APAP组细胞存活率明显降低($P<0.05$); 与APAP组比较, APAP+PZH组细胞存活率明显升高($P<0.05$)。倒置显微镜观察, 与对照组比较, APAP组细胞呈现数量减少且排列疏松的趋势; 与APAP组比较, APAP+PZH组细胞数量及排列得到显著改善。流式细胞术检测, 与对照组比较, APAP组细胞凋亡率明显升高($P<0.05$); 与APAP组比较, APAP+PZH组细胞凋亡率明显降低($P<0.05$)。试剂盒检测, 与对照组比较, APAP组细胞中LDH活性和MDA水平明显升高($P<0.05$), SOD活性明显降低($P<0.05$); 与APAP组比较, APAP+PZH组细胞中LDH活性和MDA水平明显降低($P<0.05$), SOD活性明显升高($P<0.05$)。与对照组比较, APAP组肝细胞中ROS荧光强度明显升高; 与APAP组比较, APAP+PZH组肝细胞中ROS荧光强度明显降低。与对照组比较, APAP组肝细胞中MMP明显降低; 与APAP组比较, APAP+PZH组肝细胞中MMP明显升高。Western blotting法, 与对照组比较, APAP组细胞中含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶(caspase)-9、B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)相关X蛋白(BAX)、磷酸化PI3K(p-PI3K)、磷酸化AKT(p-AKT)、磷酸化NF-κB抑制蛋白α(p-IKBα)、p-P65、磷酸化kappa B抑制因子激酶β(p-IKKβ)、白细胞介素1β(IL-1β)、白细胞介素6(IL-6)和肿瘤坏死因子α(TNF-α)蛋白表达水平明显升高($P<0.05$), Bcl-2蛋白表达水平明显降低($P<0.05$); 与APAP组比较, APAP+PZH组细胞中caspase-9、BAX、p-PI3K、p-AKT、p-IKBα、p-P65、p-IKKβ、IL-1β、IL-6和TNF-α蛋白表达水平明显降低($P<0.05$), Bcl-2蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。**结论:** PZH能够降低APAP引起的细胞内氧化应激和炎症反应, 缓解L02细胞损伤, 其作用机制可能与调控PI3K/AKT和NF-κB信号通路有关。

[关键词] 片仔癀; 药物性肝损伤; 氧化应激; 磷脂酰肌醇3-激酶; 蛋白激酶B; 核因子κB

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2024-01-05 [收稿日期] 2024-03-25

[基金项目] 吉林省卫生健康科技能力提升项目(3D5223722429)

[作者简介] 张潮鹤(1987-), 女, 吉林省长春市人, 主治医师, 医学博士, 主要从事实体肿瘤和血液肿瘤疾病诊治方面的研究。

[通信作者] 王相峰, 副主任药师(E-mail: xiangfeng1012@163.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

Protective effect of Pien-Tze-Huang on acetaminophen-induced liver injury and its mechanism

ZHANG Chaohe¹, ZHANG Xinwei^{*}, WANG Xiangfeng²

(1. Department of Hematology, Second Hospital, Jilin University, Changchun 130031, China;

2. Department of Pharmacy, Lequn Branch, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT Objective: To study the protective effect of Pien-Tze-Huang on acetaminophen-induced liver injury, and to clarify the possible mechanism. **Methods:** The human normal hepatocytes (L02 cells) were divided into control group, APAP group (10 mmol·L⁻¹ APAP), APAP+PZH group (10 mmol·L⁻¹ APAP and 0.4 mg·mL⁻¹ PZH), and PZH group (0.4 mg·mL⁻¹ PZH). The survival rates of the cells in various groups were determined by MTT method, the morphology was observed by inverted microscope, and the apoptotic rates were detected by flow cytometry. The activities of superoxide dismutase (SOD) and lactate dehydrogenase (LDH) and the levels of malondialdehyde (MDA) in the cell supernatant in various groups were detected by the kits, the reactive oxygen species (ROS) levels and the mitochondrial membrane potential (MMP) in the hepatocytes in various groups were detected by fluorescence probe. Western blotting method was used to examine the expression levels of apoptosis-related proteins, phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/protein kinase B(AKT) signaling pathway proteins, nuclear factor- κ B(NF- κ B) signaling pathway proteins and inflammatory factors in the cells in various groups. **Results:** The results of MTT showed that compared with control group, the survival rate of the cells in APAP group was markedly decreased ($P < 0.05$); compared with APAP group, the survival rate of the cells in APAP+PZH group was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with control group, the number of the L02 cells in APAP group showed a decreasing and loosely arranged trend; compared with APAP group, the number and arrangement of the L02 cells in APAP+PZH group were notably improved. The results of flow cytometry showed that compared with control group, the apoptotic rate of the L02 cells in APAP group was significantly increased ($P < 0.05$); compared with APAP group, the apoptotic rate of the cells in APAP+PZH group was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with control group, the activity of LDH and level of MDA in the cells in APAP group were significantly increased ($P < 0.05$), while the activity of SOD was significantly decreased ($P < 0.05$); compared with APAP group, the activity of LDH and level of MDA in the cells in APAP+PZH group were significantly decreased ($P < 0.05$), while the activity of SOD was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with control group, the fluorescence intensity of ROS in the cells in APAP group was significantly increased; compared with APAP group, the fluorescence intensity of ROS in APAP+PZH group was significantly decreased. Compared with control group, the MMP of the L02 cells in APAP group was significantly decreased; compared with APAP group, the MMP of the L02 cells in APAP+PZH group was significantly increased. The results of Western blotting showed that compared with control group, the expression levels of caspase-9, B-cell lymphoma 2(Bcl-2) associated X protein(BAX), phosphorylated PI3K (p-PI3K), phosphorylated AKT (p-AKT), phosphorylated NF- κ B inhibitor alpha (p-IK β), p-P65, phosphorylated inhibitor of kappaB kinase β (p-IKK β), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) proteins in the cells in APAP group were significantly increased ($P < 0.05$), while the level of Bcl-2 proteins in the cells in APAP group was significantly decreased ($P < 0.05$); compared with APAP group, the levels of caspase-3, BAX, p-PI3K, p-AKT, p-IK β , p-P65, p-IKK β , IL-1 β , IL-6, and TNF- α proteins in the cells in APAP+PZH group were significantly decreased, while the level of Bcl-2 protein was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** PZH may reduce the oxidative stress and inflammatory response in the cells by regulating the

PI3K/AKT and NF- κ B signaling pathway, therefore attenuate the L02 cell injury induced by APAP.

KEYWORDS Pien-Tze-Huang; Drug-induced liver injury; Oxidative stress; Phosphatidylinositol 3 kinase; Protein kinase B; Nuclear factor- κ B

药物性肝损伤 (drug-induced liver injury, DILI) 是指由化学药品、生物制品、中药材和中药等药品导致的肝损伤^[1]。DILI属于最常见的药物不良反应之一, 在影响药物治疗效果的同时, 还会对人体健康产生危害^[2]。流行病学研究^[3-6]显示: 全球范围内的DILI年发生率为(14~24)/10万人, 中国人群DILI年发生率约为23.8/10万人, DILI发病原因可能与高龄、基础疾病状况、用药习惯、人群中药物代谢酶和人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 基因型差异等因素有关^[7-8]。因此, 如何防范和治疗DILI仍是一项亟待解决的临床问题。对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 是全球使用最广泛的非甾体类抗炎药, 也是极易引起DILI的药物之一, 其发病率仍在逐年升高, 严重者甚至可能进展为急性肝衰竭 (acute liver failure, ALF)^[9]。目前研究^[10]表明: 在西方发达国家中APAP是导致ALF的主要原因; 在美国, 由APAP引起的ALF发生人数甚至可达ALF患者总数的约50%; 在我国, APAP所致DILI已成为继病毒性肝炎和脂肪性肝病之后的第三大肝系病种^[9]。因此, 探索一种能够有效预防和治疗APAP所致DILI的药物具有重要意义。片仔癀 (Pien-Tze-Huang, PZH) 作为我国中药的一级保护品种, 君药牛黄、蛇胆清热解毒, 臣药麝香活血通经, 佐药田七消肿止痛, 诸药合用, 共奏清热解毒、凉血化瘀、消肿止痛之功效。研究^[11-14]表明: PZH具有解热、抗炎、抗氧化、促进脂肪和酒精代谢、抗细胞凋亡、抗肿瘤、保肝、保护神经及心血管等多种功能, 目前已被广泛应用于各类肝脏疾病的治疗。PZH药理机制可能与免疫调节、抗氧化应激、调控核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号转导、调节部分细胞因子和炎症因子表达水平及调控细胞周期进程等密切相关^[14-16]。目前关于PZH能否改善APAP所致DILI的作用未见相关报道, 潜在的生物学机制也尚未明确。因此, 本研究采用APAP构建DILI细胞损伤模型, 探讨PZH对DILI的保护作用, 为明确PZH保肝护肝的潜在机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 人正常肝细胞 (L02

细胞) 购自中国科学院细胞库; PZH (批号: 2207106) 购自漳州片仔癀药业公司; 蛋白裂解液 (radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA) 购自苏州新赛美生物科技有限公司, 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素6 (interleukin-6, IL-6)、磷酸化NF- κ B P65 (phosphorylated NF- κ B P65, p-NF- κ B-P65或p-P65)、磷酸化NF- κ B抑制蛋白 α (phosphorylated NF- κ B inhibitor alpha, p-IK β)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-9-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶-9 (caspase-9)、山羊抗兔二抗、总超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性检测试剂盒、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒和线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 检测试剂盒 (JC-1) 均购自碧云天生物技术有限公司, 白细胞介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β) 抗体、B淋巴细胞瘤2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体和Bcl-2相关X蛋白 (Bcl-2 associated X protein, BAX) 抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司, 磷脂酰肌醇3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)、磷酸化PI3K (phosphorylated PI3K, p-PI3K)、蛋白激酶B (protein kinase B, AKT)、磷酸化AKT (phosphorylated AKT, p-AKT) 和磷酸化kappa B抑制因子激酶 β (phosphorylated inhibitor of kappa B kinase β , p-IKK β) 购自美国Cell Signaling Technology公司, 蛋白酶抑制剂 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 购自北京博奥拓达科技有限公司; 高速低温离心机 (型号: HR/T16N) 购自湖南赫西仪器装备有限公司, 荧光倒置显微镜 (型号: XKX41) 购自日本Olympus公司, 电泳仪 (型号: DYY-III)、转膜仪 (型号: DYCZ-40D) 和脱色摇床 (型号: WD-9405D) 均购自北京六一仪器厂, 电子分析天平 (型号: FA2004) 购自上海舜宇恒平公司。

1.2 细胞培养和分组 L02细胞复苏后, 加入完全培养基, 置于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养。完全培养基为RPMI 1640, 加入10% FBS、

100 U·mL⁻¹青霉素和100 mg·L⁻¹链霉素;含EDTA的胰酶消化20 s,轻轻吹打。待细胞形态和生长速度稳定后,选择对数生长期的细胞进行相应实验。将L02细胞分为对照组(不进行任何处理)、APAP组(10 mmol·L⁻¹ APAP)、APAP+PZH组(10 mmol·L⁻¹ APAP和0.4 g·L⁻¹ PZH)和PZH组(0.4 g·L⁻¹ PZH)。

1.3 噻唑蓝(membrane thiazolyl blue tetrazoliumomide, MTT)法检测各组肝细胞存活率

当L02细胞处于对数生长期时,以每孔 1×10^4 个细胞的密度接种于96孔细胞培养板中。在37℃、5% CO₂条件下培养24 h后,分别加入PZH(0.1、0.2、0.4和0.8 g·L⁻¹)和APAP(2.5、5.0、10.0、20.0和40.0 mmol·L⁻¹)检测各组药物不同条件下的细胞存活率。孵育24 h后,每孔加入10 μL 5% MTT,37℃避光孵育4 h,弃去上清后每孔加入150 μL DMSO溶解MTT生成的甲臜,采用酶标仪于490 nm波长处检测吸光度(A)值,计算细胞存活率。细胞存活率=实验组A值/空白组A值×100%。

1.4 倒置显微镜观察各组肝细胞形态表现

L02细胞在10 mmol·L⁻¹ APAP和PZH(0.1、0.2、0.4和0.8 g·L⁻¹)共孵育24 h后采用倒置显微镜观察并拍摄照片。

1.5 Annexin V-FITC/PI双染结合流式细胞术检测各组肝细胞凋亡率

将对数生长期的L02细胞接种于6孔细胞培养板中,10 mmol·L⁻¹ APAP+PZH(0.1、0.2、0.4和0.8 g·L⁻¹)处理24 h,收集细胞,经预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)漂洗后,重悬收集细胞,并用PBS缓冲液洗涤3次。加入Annexin V-FITC混匀,室温避光孵育15 min,再加入PI,室温避光染色,在1 h内使用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况。流式细胞仪检测结果图中,右下象限为早期细胞凋亡百分率,右上象限为晚期细胞凋亡百分率,计算各组细胞凋亡率。细胞凋亡率=早期细胞凋亡百分率+晚期细胞凋亡百分率。

1.6 采用试剂盒检测各组细胞上清液中MDA水平以及LDH和SOD活性

给药24 h后收集各组细胞上清液,参照试剂盒说明书检测各组细胞上清液中LDH活性;同时,将收集的细胞通过反复冻融进行细胞裂解,3 500 r·min⁻¹离心15 min,收集上清,BCA定量,参照试剂盒说明书检测并计算

MDA水平(mmol·g⁻¹)和SOD活性(U·mg⁻¹),统计分析采用变化程度进行比较,变化程度=实验组检测值/空白组检测值。

1.7 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)荧光探针法检测各组肝细胞中ROS水平

L02细胞接种于6孔细胞培养板中,给药24 h后,采用原位装载探针法,按1:1 000的比例用无血清培养液稀释DCFH-DA荧光探针,使其终浓度为10 μmol·L⁻¹,每孔加入工作液终体积为1 mL,37℃细胞培养箱内避光孵育20 min,吸除工作液,用无血清的培养液洗涤细胞,加入抗荧光淬灭封片剂,使用荧光倒置显微镜观察各组荧光强度。以荧光强度代表ROS水平。

1.8 JC-1荧光探针法检测各组肝细胞MMP

将L02细胞接种于6孔细胞培养板中,给药处理24 h后每孔加入1 mL JC-1染色工作液,细胞培养箱中37℃孵育20 min。孵育结束后JC-1染色缓冲液清洗2次。更换新培养基后荧光显微镜下观察各组荧光变化,根据JC-1染色原理,红色荧光越强说明MMP越高;绿色荧光越强说明MMP越低。

1.9 Western blotting法检测各组肝细胞中相关蛋白表达水平

将各组细胞加入细胞裂解液和蛋白酶抑制剂中,4℃裂解10 min后收集细胞,12 000 r·min⁻¹、4℃离心15 min收集上清,加入样品缓冲液混匀,98℃加热5 min,室温冷却后-80℃保存备用。蛋白上样后经SDS-PAGE凝胶电泳,电泳条件:120 V、2 h,将蛋白条带在200 mA、2 h条件下电转至PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,加入一抗4℃孵育过夜, TBST溶液洗膜10 min×3次后加入HRP标记的二抗室温孵育2 h, TBST溶液洗膜10 min×3次后用ECL化学发光液进行显色。使用Image J软件分析显色条带灰度值,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.10 统计学分析

采用GraphPad Prism 6.0软件进行统计学分析并绘制图像。各组细胞存活率、细胞上清液中MDA水平、LDH和SOD活性以及细胞中相关蛋白表达水平均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用SNK-*q*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组肝细胞存活率 与对照组比较, 随着APAP浓度增加, APAP组细胞存活率呈浓度依赖性降低 ($P < 0.05$), 见表1。当联合应用PZH后, 与APAP组比较, APAP+PZH组细胞存活率逐渐升高 ($P < 0.05$), 其中 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ APAP+ $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PZH组细胞存活率最高, 见表2。当PZH给药剂量低于 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 与对照组比较, APAP+PZH组对于L02细胞存活率无明显影响。见表3。

表1 不同剂量APAP作用后各组细胞存活率

Tab. 1 Survival rates of cells in various groups after treated with different doses of APAP ($n=3$)

Group	A value ($\bar{x} \pm s$)	Survival rate ($\eta/\%$)
Control	1.000 ± 0.100	100.00
APAP ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)		
2.5	$0.890 \pm 0.068^*$	88.90*
5.0	$0.880 \pm 0.059^*$	87.51*
10.0	$0.790 \pm 0.060^*$	78.87*
20.0	$0.570 \pm 0.040^*$	56.97*
40.0	$0.190 \pm 0.011^*$	19.39*

* $P < 0.05$ compared with control group.

2.2 各组肝细胞的形态表现 对照组细胞形态规整, 排列整齐, 细胞边界清楚、大小均等。APAP组细胞排列紊乱, 呈长梭状, 细胞间隙明显增宽, 细胞数较对照组明显减少。APAP+0.1、0.2和 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PZH组随着给药浓度增加, 细胞形态、排列较

表2 不同剂量PZH作用后各组细胞存活率

Tab. 2 Survival rates of cells in various groups after treated with different doses of PZH ($n=3$)

Group	A value ($\bar{x} \pm s$)	Survival rate ($\eta/\%$)
Control	1.000 ± 0.057	100.00
APAP+PZH		
$0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PZH	1.090 ± 0.049	108.52
$0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PZH	1.120 ± 0.067	112.38
$0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PZH	1.150 ± 0.043	114.69
$0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PZH	$0.650 \pm 0.053^*$	65.29*

* $P < 0.05$ compared with control group.

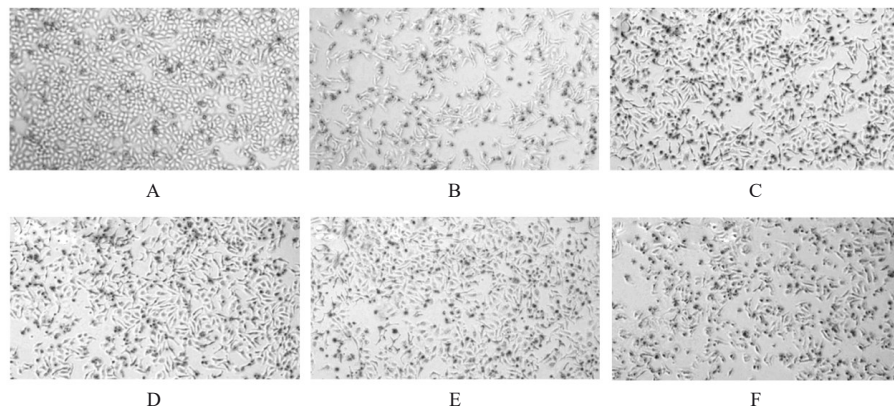
表3 不同剂量PZH联合 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ APAP作用后各组细胞存活率

Tab. 3 Survival rates of cells in various groups after treated with different doses of PZH with $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ APAP ($n=3$)

Group	A value ($\bar{x} \pm s$)	Survival rate ($\eta/\%$)
Control	1.000 ± 0.077	100.00
APAP	$0.710 \pm 0.032^*$	71.16*
APAP+ $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PZH	0.770 ± 0.037	76.75
APAP+ $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PZH	$0.820 \pm 0.044^\Delta$	81.70 $^\Delta$
APAP+ $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PZH	$0.900 \pm 0.021^\Delta$	90.30 $^\Delta$
APAP+ $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PZH	$0.400 \pm 0.026^\Delta$	40.00 $^\Delta$

* $P < 0.05$ compared with control group; $^\Delta P < 0.05$ compared with APAP group.

APAP组明显改善, APAP+ $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PZH组与空白组较为相似。而APAP+ $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PZH组细胞形态和排列较模型组未见明显改善。见图1。



A: Control group; B: APAP group; C: APAP+ $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PZH group; D: APAP+ $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PZH group; E: APAP+ $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PZH group; F: APAP+ $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PZH group.

图1 倒置显微镜下观察各组L02细胞形态表现($\times 200$)

Fig. 1 Morphology of L02 cells in various groups under inverted observed microscope ($\times 200$)

2.3 各组肝细胞凋亡率 与对照组比较, APAP组细胞凋亡率明显升高 ($P<0.05$); 与APAP组比较,

APAP+0.4 g·L⁻¹ PZH组细胞凋亡率明显降低 ($P<0.05$)。见图2和3。

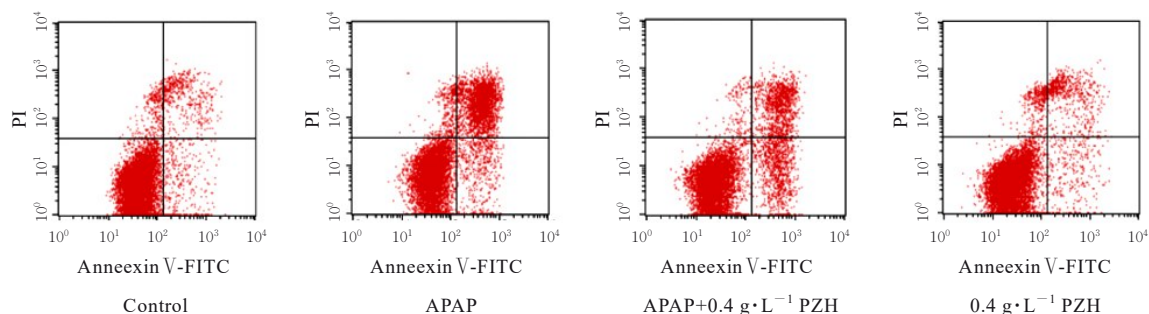
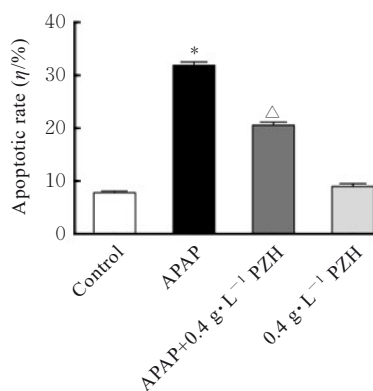


图2 流式细胞术检测各组细胞凋亡情况

Fig. 2 Apoptosis of cells in various groups detected by flow cytometry



* $P<0.05$ compared with control group; $\Delta P<0.05$ compared with APAP group.

图3 各组细胞凋亡率

Fig. 3 Apoptotic rates of cells in various groups

2.4 各组细胞上清液中MDA水平以及LDH和SOD活性 与对照组比较, APAP组细胞上清液中MDA水平和LDH活性明显升高 ($P<0.05$), SOD活性明显降低 ($P<0.05$); 与APAP组比较,

APAP+0.4 g·L⁻¹ PZH组细胞上清液中MDA水平和LDH活性明显降低 ($P<0.05$), SOD活性明显升高 ($P<0.05$); 而0.4 g·L⁻¹ PZH组细胞上清液中MDA水平以及LDH和SOD活性与对照组比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表4。

2.5 各组肝细胞中ROS水平 与对照组比较, APAP组肝细胞中ROS水平明显升高, APAP+0.4 g·L⁻¹ PZH组较APAP组ROS水平降低, 而0.4 g·L⁻¹ PZH组ROS水平与对照组比较无差异。见图4。

表4 各组细胞上清液中MDA水平以及LDH和SOD活性变化程度

Tab. 4 Change degrees of levels of MDA and activities of LDH and SOD in supernatants of cells in various groups

Group	MDA	LDH	SOD
Control	1.000±0.012	1.000±0.043	1.000±0.033
APAP	1.920±0.180*	1.840±0.090*	0.740±0.035*
APAP+0.4 g·L ⁻¹ PZH	1.400±0.033 Δ	1.290±0.071 Δ	1.000±0.110 Δ
0.4 g·L ⁻¹ PZH	1.420±0.017	0.380±0.120	0.900±0.013

* $P<0.05$ compared with control group; $\Delta P<0.05$ compared with APAP group.

2.6 各组肝细胞的MMP 与对照组比较, APAP处理后, 红色荧光被削弱, 绿色荧光增强。与APAP组比较, 给予PZH干预后, 红色荧光增强, 绿色荧光明显变淡, 表明PZH可有效逆转APAP所致的MMP降低, 增加L02细胞线粒体膜的稳定性。见图5。

2.7 各组L02细胞中caspase-9、BAX、Bcl-2、p-IKB α 、p-P65、p-IKK β 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、p-PI3K和p-AKT蛋白表达水平 与对照组比较, APAP组L02细胞中caspase-9和BAX蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$), Bcl-2蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$); 与APAP组比较, APAP+PZH 0.4 g·L⁻¹组L02细胞

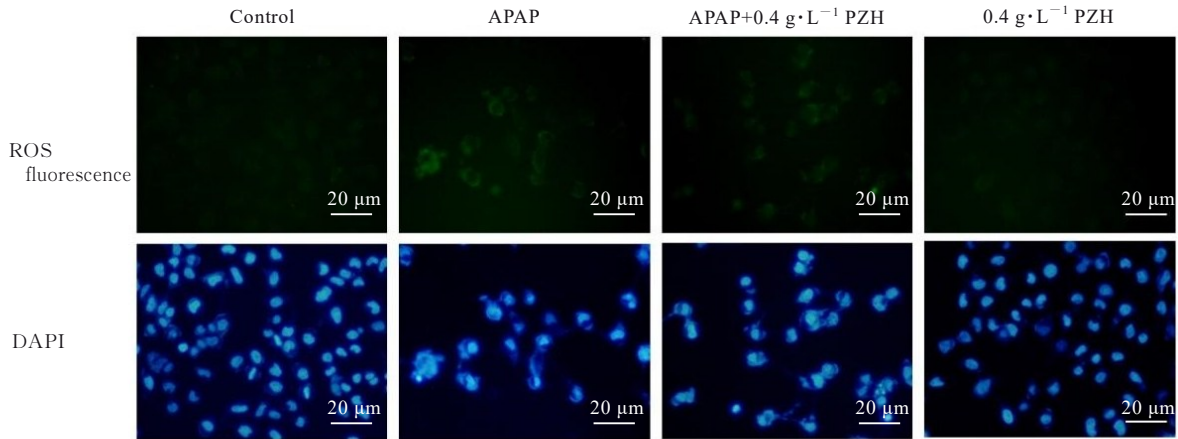


图4 各组细胞中ROS荧光强度(荧光探针)

Fig. 4 ROS fluorescence intensities in cells in various groups(Fluorescence probe)

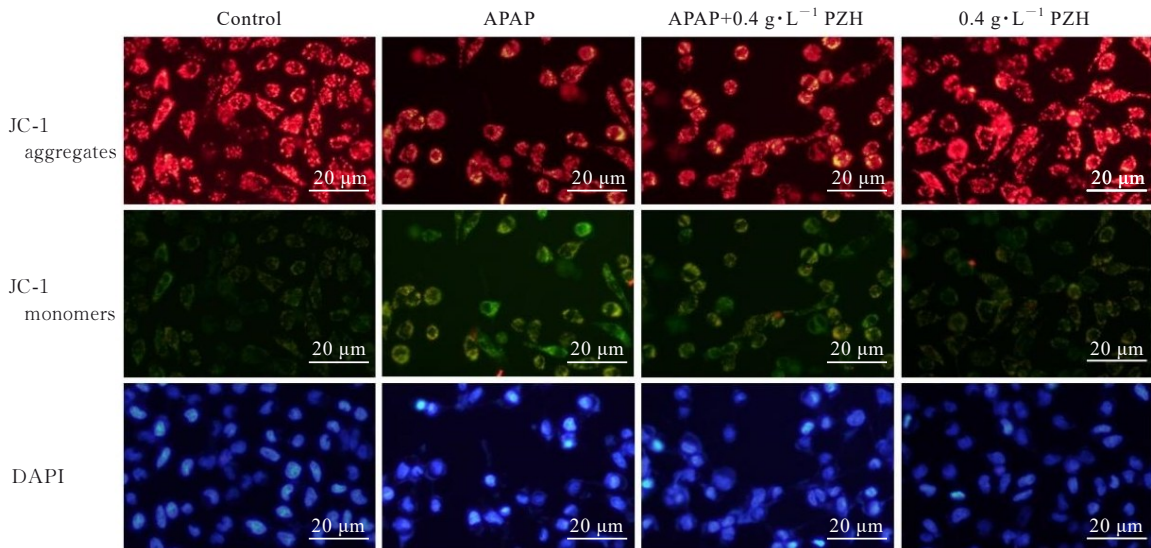


图5 各组L02细胞的MMP(JC-1荧光探针)

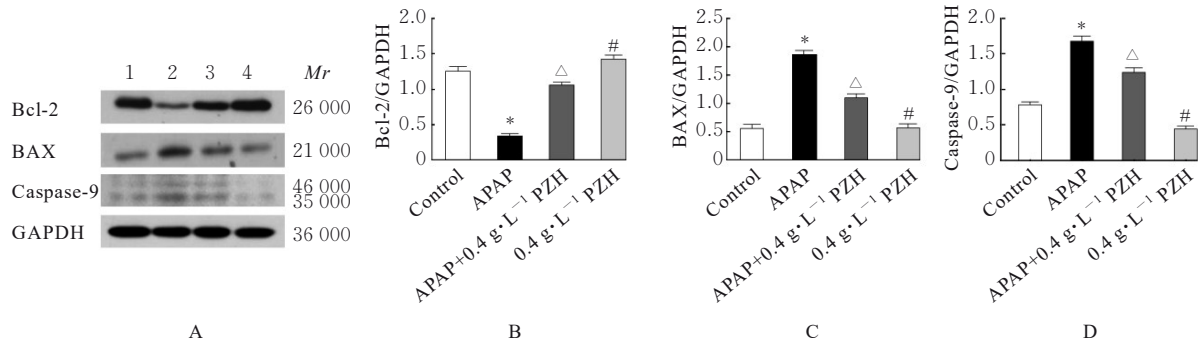
Fig. 5 MMP of L02 cells in various groups(JC-1 fluorescence probe)

胞中Bcl-2蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$), caspase-9和BAX蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见图6。与对照组比较, APAP组L02细胞中p-IKB α 、p-P65和p-IKK β 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与APAP组比较, APAP+0.4 g·L $^{-1}$ PZH组p-IKB α 、p-P65和p-IKK β 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见图7。与对照组比较, APAP组L02细胞中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与APAP组比较, APAP+0.4 g·L $^{-1}$ PZH组IL-1 β 、IL-6和TNF- α 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见图8。与对照组比较, APAP组L02细胞中p-PI3K和p-AKT蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT比值明显升高 ($P < 0.05$); 与APAP组比较, APAP+0.4 g·L $^{-1}$ PZH组L02

细胞中p-PI3K和p-AKT蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT比值明显降低 ($P < 0.05$)。见图9。

3 讨论

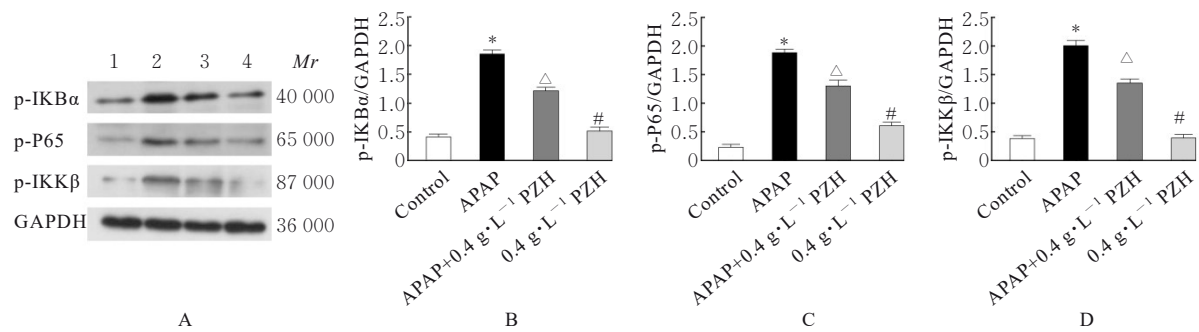
APAP是全世界范围内使用最广泛的解热镇痛药^[17], 在DILI人群中, 约7.3%的患者与APAP的使用有关^[18]。目前临床治疗DILI仅有双环醇、异甘草酸镁和N-乙酰半胱氨酸3种药物获批, 但对于低龄患者和部分DILI患者治疗效果欠佳^[19-20]。PZH作为我国的一级保护中药, 具有保肝护肝的作用, 已有研究证实PZH能够抑制NF- κ B信号通路和核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族含pyrin结构域蛋白3 [nucleotide-binding oligomerization



A: Electrophoregram (Lane 1: Control group; Lane 2: APAP group; Lane 3: APAP+0.4 g·L⁻¹ PZH group; Lane 4: 0.4 g·L⁻¹ PZH group); B-D: Histograms (B: Bcl-2; C: BAX; D: Caspase-9). **P*<0.05 compared with control group; Δ*P*<0.05 compared with APAP group; #*P*<0.05 compared with APAP+0.4 g·L⁻¹ PZH group.

图6 各组L02细胞中Bcl-2、caspase-9和BAX蛋白表达电泳图(A)及直条图(B~D)

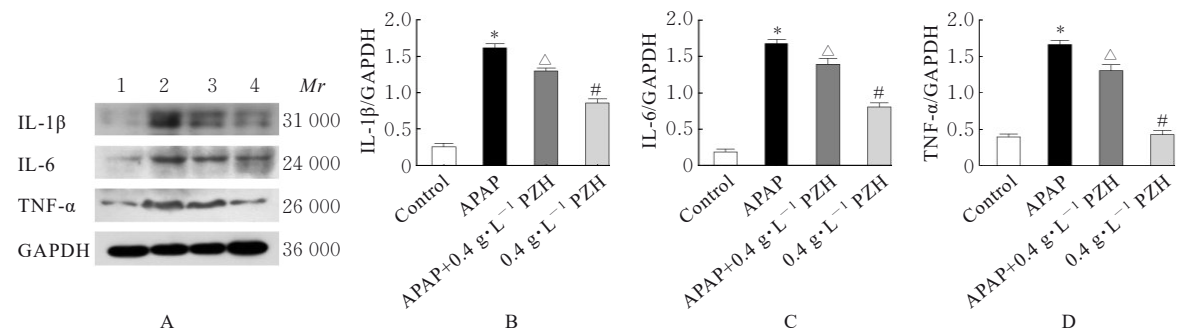
Fig. 6 A. Electrophoregram (A) and histograms (B-D) of expressions of Bcl-2, caspase-9, and BAX proteins in L02 cells in various groups



A: Electrophoregram (Lane 1: Control group; Lane 2: APAP group; Lane 3: APAP+0.4 g·L⁻¹ PZH group; Lane 4: 0.4 g·L⁻¹ PZH group); B-D: Histograms (B: p-IKBα; C: p-P65; D: p-IKKβ). **P*<0.05 compared with control group; Δ*P*<0.05 compared with APAP group; #*P*<0.05 compared with APAP+0.4 g·L⁻¹ PZH group.

图7 各组L02细胞中p-IKBα、p-P65和p-IKKβ蛋白表达电泳图(A)及直条图(B~D)

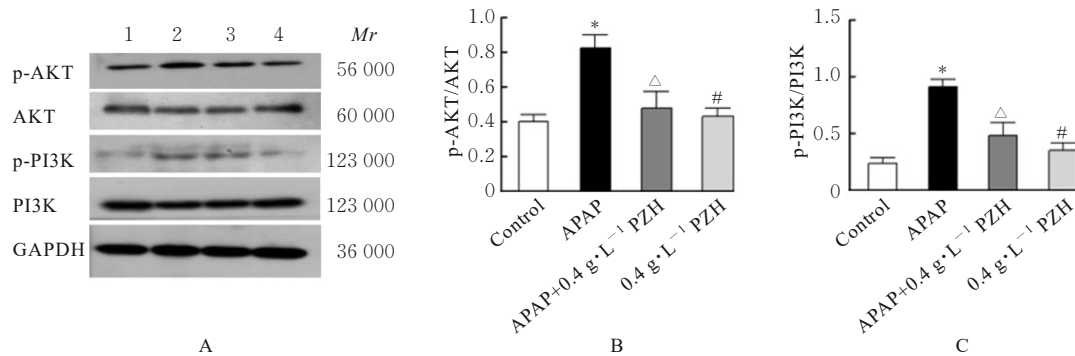
Fig. 7 Electrophoregram (A) and histograms (B-D) of expressions of p-IKBα, p-P65, and p-IKKβ proteins in L02 cells in various groups



A: Electrophoregram (Lane 1: Control group; Lane 2: APAP group; Lane 3: APAP+0.4 g·L⁻¹ PZH group; Lane 4: 0.4 g·L⁻¹ PZH group); B-D: Histograms (B: IL-1β; C: IL-6; D: TNF-α). **P*<0.05 compared with control group; Δ*P*<0.05 compared with APAP group; #*P*<0.05 compared with APAP+0.4 g·L⁻¹ PZH group.

图8 各组L02细胞中IL-1β、IL-6和TNF-α蛋白表达电泳图(A)及直条图(B~D)

Fig. 8 Electrophoregram (A) and histograms (B-D) of expressions of IL-1β, IL-6, and TNF-α proteins in L02 cells in various groups



A: Electrophoregram (Lane 1: Control group; Lane 2: APAP group; Lane 3: APAP+0.4 g·L⁻¹ PZH group; Lane 4: 0.4 g·L⁻¹ PZH group); B-D: Histograms (B: p-AKT; C: p-PI3K). * $P < 0.05$ compared with control group; $^{\Delta}P < 0.05$ compared with APAP group; # $P < 0.05$ compared with APAP+0.4 g·L⁻¹ PZH group.

图9 各组L02细胞中p-PI3K和p-AKT蛋白表达电泳图(A)及直条图(B~D)

Fig. 9 Electrophoregram (A) and histograms (B~C) of expressions of p-PI3K and p-AKT proteins in L02 cells in various groups

domain (NOD) -like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3] 炎症小体活化, 调控细胞自噬和凋亡等多种途径发挥护肝抗炎的作用^[11, 21-23]。

本研究使用APAP成功构建L02细胞损伤模型, 结果显示: 损伤后的细胞存活率明显降低, 细胞形态出现皱缩、破损以及排列不规则等情况, 细胞内活性氧蓄积以及线粒体膜电位降低; 而给予PZH后能明显减轻肝细胞的受损程度, 改善细胞形态并减少细胞凋亡。

既往研究^[24]表明: DILI模型中, 氧化应激损伤是导致细胞凋亡的重要原因, 主要表现为活性氧ROS蓄积、抗氧化物质减少和MMP降低等。本研究结果显示: APAP会导致细胞氧化应激损伤, 改变细胞氧化还原稳态; 进行PZH干预后细胞的抗氧化水平得到显著提高。

PI3K/AKT作为一种经典的信号转导途径, 能够参与免疫应答和炎症反应等多种生理病理过程, 由其驱动产生的IL-6和IL-1 β 等多种炎症因子是加重肝细胞损伤的重要因素^[25]。NF- κ B是一组能够调节多种基因表达的核蛋白因子, 在氧化应激、炎症反应、细胞增殖、分化及凋亡等过程中发挥重要调控作用。研究^[23]表明: NF- κ B作为细胞内重要的核转录因子, 也是AKT的下游靶点, 磷酸化AKT可激活该通路, 使p65激活并易位到细胞核, 与靶基因结合促进炎症因子(IL-1 β 、IL-6和TNF- α)的释放。ZHENG等^[23]发现PZH可以抑制NF- κ B信号转导, 降低小鼠体内炎症反应水平, 从而明显

缓解四氯化碳诱导的肝纤维化, 并且减少细胞凋亡。采用Western blotting法进一步检测L02细胞中相关蛋白的表达情况, APAP给药后p-IK β 、p-P65、p-IKK β 、p-PI3K和p-AKT等蛋白磷酸化水平增加, 提示PI3K/AKT和NF- κ B信号通路被激活, 并进一步促使IL-1 β 、IL-6和TNF- α 等表达增加, 表明炎症的发生。本研究结果显示: PZH对L02细胞的保护作用与调控上述信号通路密切相关, 降低APAP引起的相关蛋白磷酸化表达, 抑制炎症因子生成, 减少细胞凋亡。

综上所述, PZH对APAP所致DILI具有保护作用, 其机制可能与抑制PI3K/AKT和NF- κ B信号通路, 减少炎症因子产生, 增强细胞抗氧化应激能力等因素有关。本研究已通过L02体外细胞实验揭示PZH对肝细胞的保护作用及其机制, 后续将开展动物实验, 进一步补充PZH的体内研究证据, 为PZH的治疗应用提供理论依据。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

张潮鹤和张昕玮参与论文选题、实验设计、实验操作、数据收集、数据分析、统计学分析和论文撰写, 王相峰参与论文选题、实验设计和论文修改。

[参考文献]

- [1] 中国医药生物技术协会药物性肝损伤防治技术专业委员会, 中华医学会肝病学分会药物性肝病学组. 中国药物性肝损伤诊治指南(2023年版)[J]. 中华肝脏病杂志,

- 2023, 31(4): 355-384.
- [2] 彭小蓉, 常宇南, 秦涛, 等. 儿童药物性肝损伤临床诊治进展[J]. 中华肝脏病杂志, 2023, 31(4): 440-444.
- [3] TUJIOS S R, LEE W M. Acute liver failure induced by idiosyncratic reaction to drugs: Challenges in diagnosis and therapy[J]. *Liver Int*, 2018, 38(1): 6-14.
- [4] LI X, TANG J, MAO Y. Incidence and risk factors of drug-induced liver injury[J]. *Liver Int*, 2022, 42(9): 1999-2014.
- [5] 沈毅, 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.
- [6] 刘成海. 中草药相关肝损伤的研究进展与挑战[J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(8): 1505-1511.
- [7] 刘茹佳, 辛小娟. 药物性肝损伤发生机制、危险因素、监测以及再用药的研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2023, 39(4): 968-973.
- [8] 支阳, 唐洁婷, 茅益民. 药物性肝损伤的遗传易感性[J]. 中华肝脏病杂志, 2023, 31(6): 653-658.
- [9] 王素媛. DDX60促进对乙酰氨基酚诱导急性肝损伤的功能和机制研究[D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2021.
- [10] 余朋飞, 吴桥, 段钟平, 等. 对乙酰氨基酚致药物性肝损伤的机制研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(9): 2108-2112.
- [11] CHEN Z. Pien Tze Huang (PZH) as a multifunction medicinal agent in traditional Chinese medicine (TCM): a review on cellular, molecular and physiological mechanisms[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 146.
- [12] LIU C, CHEN Z, WU S LY, et al. Comparative Review of effects of Pien Tze Huang and AnGong NiuHuang Pill and their potential on treatment of central nervous system diseases [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2022, 22(18): 2350-2360.
- [13] HUANG L, ZHANG Y, ZHANG X, et al. Therapeutic potential of Pien-Tze-Huang: a review on its chemical composition, pharmacology, and clinical application[J]. *Molecules*, 2019, 24(18): 3274.
- [14] 熊祎, 曾鑫, 刘妙华, 等. 片仔癀治疗肝脏疾病的药理作用研究进展[J]. 江西中医药大学学报, 2023, 35(1): 116-118, 124.
- [15] 王帆, 朱翊瑞, 刘成海, 等. 对乙酰氨基酚致药物性肝损伤的分子机制[J]. 肝脏, 2021, 26(8): 939-942.
- [16] CHANG L, XU D, ZHU J, et al. Herbal therapy for the treatment of acetaminophen-associated liver injury: recent advances and future perspectives [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 313.
- [17] BRUNE K, RENNER B, TIEGS G. Acetaminophen/paracetamol: A history of errors, failures and false decisions[J]. *Eur J Pain*, 2015, 19(7): 953-965.
- [18] CHIDIAC A S, BUCKLEY N A, NOGHREHCHI F, et al. Paracetamol (acetaminophen) overdose and hepatotoxicity: mechanism, treatment, prevention measures, and estimates of burden of disease [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2023, 19(5): 297-317.
- [19] TANG J, GU J, CHU N, et al. Efficacy and safety of bicyclol for treating patients with idiosyncratic acute drug-induced liver injury: A multicenter, randomized, phase II trial[J]. *Liver Int*, 2022, 42(8): 1803-1813.
- [20] WANG Y, WANG Z, GAO M, et al. Efficacy and safety of magnesium isoglycyrrhizinate injection in patients with acute drug-induced liver injury: A phase II trial[J]. *Liver Int*, 2019, 39(11): 2102-2111.
- [21] 许赞术, 谭耀龙, 张庆, 等. 片仔癀对酒精诱导的急性肝损伤小鼠自噬和NLRP3炎症小体活化的影响[J]. 药学研究, 2023, 42(8): 537-542.
- [22] ZHAO R, ZHANG Q, LIU W, ET al. Pien Tze Huang attenuated acetaminophen-induced liver injury by autophagy mediated-NLRP3 inflammasome inhibition[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 311: 116285.
- [23] ZHENG H, WANG X, ZHANG Y, et al. Pien-Tze-Huang ameliorates hepatic fibrosis via suppressing NF- κ B pathway and promoting HSC apoptosis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 244: 111856.
- [24] 李国平, 吴灵飞, 蒲泽锦. 氧化应激诱导HepG2肝癌细胞凋亡的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(1): 105-111.
- [25] 宋添力, 唐浪, 王一民, 等. 竹节参多糖通过PI3K/AKT/NF- κ B信号通路对急性肝损伤大鼠的影响[J]. 精细化工, 2023, 40(11): 2472-2479, 2534.

* 吉林大学药学院2019级临床药学专业