

## · 基础研究 ·

## 大黄素恢复自噬减轻脂多糖诱导的急性肝损伤

何小姣<sup>1</sup> 黄崧<sup>2</sup> 谢彬<sup>2</sup> 刘明华<sup>2</sup><sup>1</sup> 武警重庆总队医院药剂科 400061; <sup>2</sup> 陆军军医大学第一附属医院急救创伤中心, 重庆 400038

通信作者: 黄崧, Email: huangsong@cqmu.edu.cn

**【摘要】目的** 探讨大黄素在 D-氨基半乳糖胺 (D-galactosamine, D-GalN) / 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的急性肝损伤中的保护作用及其机制。**方法** 将 40 只 BALB/c 雄性小鼠按随机数字法分为 5 组 ( $n=8$ ), 对照组、大黄素组、D-GalN/LPS 组、大黄素 + D-GalN/LPS 组和自噬抑制剂 3-MA+ 大黄素 + D-GalN/LPS 组。经小鼠腹腔注射 D-GalN (700 mg/kg) / LPS (10  $\mu$ g/kg) 诱导急性肝损伤模型。3-MA (15 mg/kg) 和 (或) 大黄素 (20 mg/kg) 腹腔注射于模型建立前 30 min, 6 h 后在麻醉下处死小鼠并采集血、肝组织标本。采用比色定量法检测血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 水平、肝组织髓过氧化物酶 (MPO) 活性, 采用 ELISA 法检测血清中肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 -6 (IL-6) 的水平, HE 染色观察肝组织病理学改变, Western blot 检测肝组织自噬蛋白 LC3- II、Beclin1 的表达量, 并分析实验动物生存率。定量资料比较采用单因素方差分析, 采用 SNK- $q$  检验进行两两比较, 方差不齐时采用 Games-Howell 检验。**结果** 与对照组相比, D-GalN/LPS 组 AST、ALT、TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平和 MPO 活性 [(2 476.80  $\pm$  263.14) U/L、(271.71  $\pm$  47.15) U/L、(537.92  $\pm$  89.35) pg/mL、(169.74  $\pm$  25.52) pg/mL、(1.37  $\pm$  0.22) U/mg] 显著升高 ( $P<0.05$ )。与 D-GalN/LPS 组相比, 大黄素 + D-GalN/LPS 组 AST、ALT、TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平和 MPO 活性 [(1 248.01  $\pm$  380.70) U/L、(142.59  $\pm$  34.63) U/L、(288.91  $\pm$  67.21) pg/mL、(61.83  $\pm$  13.64) pg/mL、(0.80  $\pm$  0.21) U/mg] 显著降低 ( $P<0.05$ )。与 D-GalN/LPS 组相比, 大黄素 + D-GalN/LPS 组可明显减轻肝组织肝细胞的病理损伤, 提高小鼠生存率。与对照组相比, D-GalN/LPS 组肝组织 LC3- II、Beclin1 表达下降; 而与 D-GalN/LPS 组相比, 大黄素 + D-GalN/LPS 组肝组织 LC3- II、Beclin1 表达升高。联合自噬抑制剂 3-MA 后大黄素的肝保护效应被逆转, AST、ALT、TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平和 MPO 活性 [(2 398.78  $\pm$  233.57) U/L、(242.79  $\pm$  43.46) U/L、(505.07  $\pm$  67.89) pg/mL、(151.46  $\pm$  14.11) pg/mL、(1.27  $\pm$  0.15) U/mg] 升高 ( $P<0.05$ ), 肝组织病理损伤加重。**结论** 大黄素减轻 D-GalN/LPS 诱导的急性肝损伤, 这可能与激活 LC3- II、Beclin1 蛋白恢复自噬有关。

**【关键词】** 大黄素; 脂多糖; 急性肝损伤; 自噬**基金项目:** 重庆市科卫联合医学科研项目 (2019MSXM012); 陆军军医大学第一附属医院院管课题 (SWH2018QNKJ-20)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2021.05.007

**Emodin reactivated autophagy and alleviated D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced acute liver injury**He Xiaojiao<sup>1</sup>, Huang Song<sup>2</sup>, Xie Bin<sup>2</sup>, Liu Minghua<sup>2</sup><sup>1</sup>Department of Pharmacy, Chongqing Armed Corps Police Hospital, Chongqing 400061, China; <sup>2</sup>Center of Emergency and Trauma, First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding author: Huang Song, Email: huangsong@cqmu.edu.cn

**【Abstract】Objective** To explore the protective effect of emodin on D-galactosamine (D-GalN)/lipopolysaccharide (LPS)-induced acute liver injury and its mechanism. **Methods** A total of 40 male BALB/c mice were randomly (random number) divided into 5 groups ( $n=8$  in each group):

the control group, the emodin group, the D-GalN/LPS group, the emodin+D-GalN/LPS group and the 3-MA+emodin+D-GalN/LPS group. D-GalN (700 mg/kg) and LPS (10  $\mu$ g/kg) were intraperitoneally injected to induce acute liver injury in mice. Autophagy inhibitor 3-MA (15 mg/kg) and/or emodin (20 mg/kg) were intraperitoneally injected 30 min before the liver injury model. The animals were sacrificed under anaesthesia 6 h after D-GalN/LPS challenge, blood samples and liver tissues were collected. The levels of alanineaminotransferase (ALT) and aspartateaminotransferase (AST) in serum, and myeloperoxidase (MPO) activity of liver tissues were determined by colorimetric quantitative method; the levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and interleukin-6 (IL-6) were measured by ELISA; the expression of LC3-II and Beclin 1 in the liver tissues were evaluated by Western blot; the pathological changes of liver was evaluated by HE staining. Animal survival rate was also analyzed. The one-way ANOVA was used to compare quantitative data, SNK-*q* test was used for pairwise comparison between two groups, and Games-Howell test was used when homogeneity of variance were not met. **Results** Compared with the control group, the levels of ALT, AST, TNF- $\alpha$ , IL-6 and MPO activity [(2 476.80  $\pm$  263.14) U/L, (271.71  $\pm$  47.15) U/L, (537.92  $\pm$  89.35) pg/mL, (169.74  $\pm$  25.52) pg/mL, and (1.37  $\pm$  0.22) U/mg] were obviously increased in the D-GalN/LPS group ( $P < 0.05$ ). Compared with the D-GalN/LPS group, the levels of ALT, AST, TNF- $\alpha$ , IL-6 and MPO activity [(1 248.01  $\pm$  380.70) U/L, (142.59  $\pm$  34.63) U/L, (288.91  $\pm$  67.21) pg/mL, (61.83  $\pm$  13.64) pg/mL, and (0.80  $\pm$  0.21) U/mg] were obviously decreased in the emodin+ D-GalN/LPS group ( $P < 0.05$ ). Compared with the D-GalN/LPS group, the histopathological abnormalities in liver tissue were significantly alleviated and the survival rate of mice was improved in the emodin+ D-GalN/LPS group. Compared with the control group, the expression of LC3-II and Beclin1 was decreased in the liver tissue in the D-GalN/LPS group, while compared with the D-GalN/LPS group, the expression of LC3-II and Beclin1 was increased in the emodin+ D-GalN/LPS group. With co-administration of 3-MA, the protective effects of emodin in acute liver injury were reversed, the levels of AST, ALT, TNF- $\alpha$ , IL-6, and MPO [(2 398.78  $\pm$  233.57) U/L, (242.79  $\pm$  43.46) U/L, (505.07  $\pm$  67.89) pg/mL, (151.46  $\pm$  14.11) pg/mL, and (1.27  $\pm$  0.15) U/mg] were increased, and the pathological damage of liver tissue was aggravated. **Conclusions** Emodin alleviates D-GalN/LPS-induced acute liver injury in mice, which may be related to the activation of protein LC3-II, Beclin1 and restored autophagy.

【**Keywords**】 Emodin; Lipopolysaccharide; Acute liver injury; Autophagy

**Fund program:** Foundation of the Hospital Management of First Affiliated Hospital of Army Medical University (SWH2018QNKJ-20); Chongqing Health Commission Program (2019MSXM012)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2021.05.007

急性肝衰竭 (acute liver failure, ALF) 是一种严重威胁生命的临床综合征, 短时间内大量肝细胞变性坏死等一系列急性病理学与生理学改变, 导致肝细胞功能急剧下降, 其临床特征为凝血功能障碍、肝性脑病和多器官功能衰竭等, 不仅临床发病率高, 同时伴有极高的病死率<sup>[1-2]</sup>。目前导致 ALF 的病因很多, 例如病毒、药物、毒素、酒精、代谢性疾病或自身免疫等<sup>[3-5]</sup>, 然而预防或治疗 ALF 的措施仍然非常有限。由药物 D-氨基半乳糖胺 (D-galactosamine, D-GalN) / 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱发的急性肝损伤动物实验模型, 被广泛用于研究临床肝炎的病理发生机制和新型肝保护剂的开发<sup>[6-8]</sup>。

大黄素 (emodin) 是一种从传统中草药大黄根茎中分离提取的蒽醌类化合物, 具有抗菌、抗炎、抗氧化、抗纤维化和抗癌等药理作用<sup>[9-11]</sup>。研究表

明大黄素对肝脂肪变性和四氯化碳诱导的肝损伤具有保护作用<sup>[12-13]</sup>。此外, 研究表明大黄素可以抑制各种炎症模型中促炎细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的产生<sup>[14-16]</sup>。以上研究提示大黄素具有对炎症反应负性调节作用。有研究表明自噬与炎症有着紧密的联系, 其中由内毒素诱导的急性肺损伤中, 自噬相关蛋白 LC3- II 表达显著降低<sup>[17]</sup>, 而激活自噬将减轻炎症反应<sup>[18-20]</sup>。然而, 大黄素在 D-GalN/LPS 诱导的急性肝损伤中的作用与自噬蛋白 LC3- II 等表达的关系尚不清楚。因此, 本研究旨在观察大黄素对 D-GalN/LPS 诱导的急性肝损伤的药理作用机制及其与自噬的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与试剂

所有 BALB/c 雄性小鼠, 6~8 周龄 (体质量

18~22 g), 购于陆军军医大学实验动物中心, 实验动物生产许可证 [SCXK(渝)2017-0002]。所有涉及动物实验操作均严格按照陆军军医大学实验动物中心动物伦理规范进行。实验用药物 LPS (L2880, 大肠杆菌 055:B5)、D-GalN (A2795)、emodin (E7881) 购于美国 sigma 公司, 自噬抑制剂 3-MA (3-methyl-3H-purin-6-amine) 购于美国 Cayman 公司 (13242); 丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) (C009-1-1)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) (C010-1-1)、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) (A044-1-1) 检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所; 肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (EMC102a)、白细胞介素 -6 (IL-6) (EMC004) 检测试剂盒购于深圳欣博盛生物科技有限公司; 内参 GAPDH (5174S)、LC3- II (3868S)、Beclin1 (4395S) 一抗及二抗均购自 Cell Signaling Technology 公司; 化学发光 ECL (K-1243-D10) 试剂盒购于美国 Advantsta 公司; BCA 蛋白定量分析试剂盒 (23225) 购于美国 Thermo 公司。

### 1.2 动物模型建立与分组

第一部分动物实验分组。将 40 只小鼠采用随机数字表法分为 5 组 ( $n=8$ ): 对照组、大黄素组、D-GalN/LPS 组、大黄素 + D-GalN/LPS 组、3-MA + 大黄素 + D-GalN/LPS 组。第二部分生存率实验分组见下文 1.8 部分。急性肝损伤模型建立经小鼠腹腔注射 D-GalN (700 mg/kg) / LPS (10  $\mu$ g/kg) 诱导。各组动物腹腔药物注射情况说明: 对照组注射等量药物溶剂, NS+DMSO: 食用玉米油; 大黄素组注射大黄素 (20 mg/kg) + DMSO: 食用玉米油; D-GalN/LPS 组腹腔内注射 LPS (10  $\mu$ g/kg) + D-GalN (700 mg/kg); 大黄素 + D-GalN/LPS 组模型建立前 30 min 注射大黄素 20 mg/kg; 3-MA + 大黄素 + D-GalN/LPS 组模型建立前, 按间隔 30 min 依次注射 3-MA 15 mg/kg、大黄素 20 mg/kg。各组模型药物注射 6 h 后麻醉处死, 采集血浆、肝组织标本, 部分肝组织用于病理组织切片, 其余组织 -80  $^{\circ}$ C 低温冰箱保存用于后期相关实验检测。

### 1.3 转氨酶 ALT、AST 的检测

根据检测试剂盒说明书相关操作步骤, 预先制作待测小鼠血浆标本, 依步骤加样及相关试剂, 直至最后一步显色, 酶标仪 505 nm 波长下, 检测各样本吸光度值, 根据标准曲线公式求得各样本中 ALT、AST 实际含量。

### 1.4 ELISA 法检测 TNF- $\alpha$ 、IL-6

根据 TNF- $\alpha$ 、IL-6 检测试剂盒操作说明书, 预制待测样本, 并依次完成操作步骤, 加样及各种试剂, 直至最后一步显色。酶标仪 450 nm 下, 测定各样本吸光度值, 根据标准品曲线公式计算实际样本的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 浓度。

### 1.5 肝组织 MPO 活性检测

依据检测试剂盒操作说明书, 准备实验器材、仪器设备, 并将采集的肝组织匀浆制备待测样本, 按步骤完成操作直至最后一步。酶标仪 450 nm 下测得各样本吸光度值, 同时检测制备的各样本蛋白浓度, 根据说明书内容将各样本总蛋白进行标准化对比得出结果。

### 1.6 肝组织 HE 染色

将 4% 多聚甲醛固定后的部分肝组织, 依次脱水、包埋、切片、苏木精 - 伊红 (HE) 染色、烘干、脱水、固定、封片, 光学显微镜下观察并拍摄记录各组肝组织病理切片变化。

### 1.7 Western blot 检测 LC3- II、Beclin1 蛋白表达量

制备肝组织蛋白上样样本, 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离各样本蛋白, 然后电转至 NC 膜上, 牛奶封闭 2 h, 一抗 LC3- II (1 : 1 500 稀释)、Beclin1 抗体 (1 : 2 000 稀释), 内参 GAPDH 抗体 (1 : 3 000 稀释), 冰箱 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗涤 (3 次, 20 min/次), 二抗 (1 : 2 000 稀释) 室温孵育 2 h, 再次洗涤, 条带上滴 ECL 荧光液, 充分结合 (5 min), 在发光仪上显影并记录蛋白表达图片, 保存后使用专业软件后期分析条带灰度值。

### 1.8 生存率分析

100 只小鼠随机 (随机数字法) 分 5 组 ( $n=20$ ): 对照组、大黄素组、D-GalN / LPS 组、大黄素 + D-GalN/LPS 组、3-MA + 大黄素 + D-GalN/LPS 组, 观察并记录各组小鼠 72 h 生存情况, 采用 Kaplan-Meier 法绘制及描述小鼠生存率曲线图。

### 1.9 统计学方法

GraphPad Prism 5 软件制图及处理数据, 使用 SPSS 22.0 软件分析数据, 正态分布计量资料采用均数  $\pm$  标准差 (Mean  $\pm$  SD) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两组间比较采用 SNK- $q$  检验, 方差不齐时采用 Games-Howell 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠肝转氨酶、存活率和肝组织病理改变

本研究首先确定了大黄素对 D-GalN/LPS 诱导

的小鼠急性肝损伤中肝转氨酶水平的作用。与对照组比较, D-GalN/LPS 组 6 h 时 ALT 和 AST 水平明显升高 ( $P<0.05$ ), 而大黄素 +D-GalN/LPS 组肝脏转氨酶水平显著降低 ( $P<0.05$ ), 见表 1。同时, 与 D-GalN/LPS 组比较, 大黄素 +D-GalN/LPS 组显著提高了小鼠的存活率, 见图 1。组织病理学检查显示, 由 D-GalN/LPS 诱导的肝脏组织显著异常, 肝小叶间结构不清, 肝索结构破坏, 大量肝细胞死亡同时并存有大量红细胞淤积; 而大黄素 +D-GalN/LPS 组可明显减轻这些组织病理学改变, 见图 2。以上结果提示, 大黄素可改善 D-GalN/LPS 诱导的小鼠急性肝损伤。自噬抑制剂 3-MA 在本研究中主要用作干预自噬发生, 结果显示 3-MA 逆转了大黄素对小鼠急性肝损伤保护作用, 转氨酶、生存率、组织病理学变化见表 1、图 1~2。提示自噬可能参与大黄素对 D-GalN/LPS 诱导的急性肝损伤的保护作用。

### 2.2 各组小鼠炎症因子水平变化

本研究结果显示, 炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 在 D-GalN/LPS 组中显著升高 ( $P<0.05$ ), 与对照组比较, 大黄素 +D-GalN/LPS 组炎症因子产生抑制 ( $P<0.05$ ), 见表 2。为进一步评估嗜中性粒细胞的浸润程度, 本研究检测肝脏组织中 MPO 活性, 与对照组比较, D-GalN/LPS 组 MPO 活性明显上调 ( $P<0.05$ ), 而大黄素 +D-GalN/LPS 组可显著抑制其上调, 这与组织病理学检查中所观察到的白细胞浸润减少一致。3-MA 对自噬的抑制阻断了大黄素对 D-GalN/LPS 暴露小鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 MPO 活性的抑制作用。提示自噬可能有助于大黄素对 D-GalN/LPS 诱导的急性肝损伤的保护作用。

### 2.3 各组小鼠肝组织自噬相关蛋白表达变化

为探讨大黄素对 D-GalN/LPS 诱导的急性肝损伤保护作用机制, 检测了肝脏组织自噬相关蛋白表达水平。蛋白免疫印迹分析结果显示小鼠 D-GalN/LPS 暴露后, 与对照组 ( $1.01 \pm 0.17$ ;  $1.01 \pm 0.16$ )

表 1 各组小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 水平的比较 (Mean  $\pm$  SD,  $n=8$ )

Table 1 Comparison of serum ALT and AST levels among different groups (Mean  $\pm$  SD,  $n=8$ )

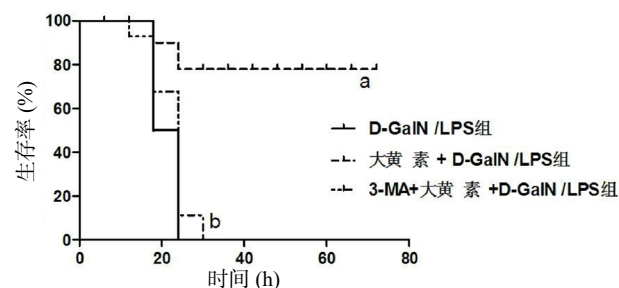
组别	ALT (U/L)	AST (U/L)
对照组	192.97 $\pm$ 68.58	34.52 $\pm$ 14.47
大黄素组	200.37 $\pm$ 60.59	33.37 $\pm$ 17.82
D-GalN/LPS 组	2 476.80 $\pm$ 263.14 <sup>a</sup>	271.71 $\pm$ 47.15 <sup>a</sup>
大黄素 + D-GalN/LPS 组	1 248.01 $\pm$ 380.70 <sup>b</sup>	142.59 $\pm$ 34.63 <sup>b</sup>
3-MA+ 大黄素 +D-GalN/LPS 组	2 398.78 $\pm$ 233.57 <sup>c</sup>	242.79 $\pm$ 43.46 <sup>c</sup>
F 值	181.50	86.15
P 值	<0.01	<0.01

注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与 D-GalN/LPS 组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; 与大黄素 +D-GalN/LPS 组比较, <sup>c</sup> $P<0.05$

比较, D-GalN/LPS 组 Beclin1 和 LC3- II 水平表达显著降低 ( $0.77 \pm 0.16$ ;  $0.75 \pm 0.20$ ) ( $P<0.05$ )。而大黄素干预后, 与 D-GalN/LPS 组对比 Beclin1 和 LC3- II 表达水平显著上调 ( $1.05 \pm 0.17$ ;  $1.04 \pm 0.13$ ) ( $P<0.05$ ), 见图 3。以上结果表明大黄素对急性肝损伤的保护机制可能与自噬激活有关。

## 3 讨论

我国传统中药大黄具有清热解毒、利湿退黄、舒经通络、保肝利胆等功效<sup>[21]</sup>。而大黄素作为其有效成分之一, 不仅具有抗菌、抗病毒、抗氧化、抗肿瘤等作用, 越来越多的证据表明大黄素在炎症反应中也起着重要的调节作用<sup>[22-24]</sup>。本研究结果显示, 大黄素对于急性肝损伤模型小鼠可通过抑制肝



与 D-GalN/LPS 组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与大黄素 +D-GalN/LPS 组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$

图 1 各组小鼠生存情况 ( $n=20$ )

Fig 1 The survival rate of each group ( $n=20$ )

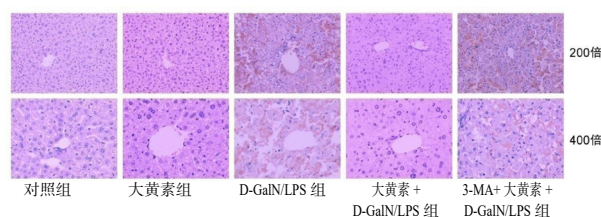


图 2 各组小鼠肝组织病理学改变 (HE 染色)

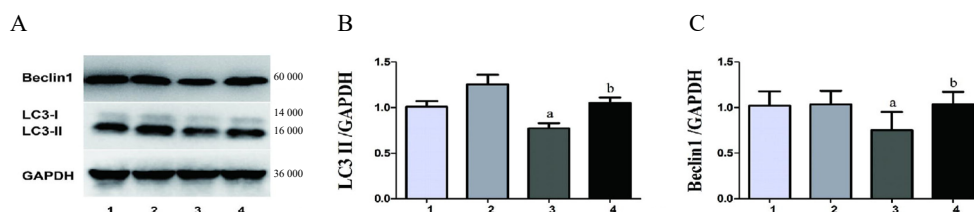
Fig 2 The liver histological abnormalities of each group (HE staining)

表 2 各组小鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、MPO 的含量比较 (Mean  $\pm$  SD,  $n=8$ )

Table 2 Comparison of serum TNF- $\alpha$ , IL-6 and MPO levels among different groups (Mean  $\pm$  SD,  $n=8$ )

组别	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	MPO (U/mg)
对照组	183.93 $\pm$ 16.88	19.75 $\pm$ 5.00	0.19 $\pm$ 0.07
大黄素组	193.00 $\pm$ 34.35	19.52 $\pm$ 6.20	0.18 $\pm$ 0.04
D-GalN/LPS 组	537.92 $\pm$ 89.35 <sup>c</sup>	169.74 $\pm$ 25.52 <sup>b</sup>	1.37 $\pm$ 0.22 <sup>c</sup>
大黄素 + D-GalN/LPS 组	288.91 $\pm$ 67.21 <sup>b</sup>	61.83 $\pm$ 13.64 <sup>b</sup>	0.80 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>
3-MA+ 大黄素 +D-GalN/LPS 组	505.07 $\pm$ 67.89 <sup>c</sup>	151.46 $\pm$ 14.11 <sup>c</sup>	1.27 $\pm$ 0.15 <sup>c</sup>
F 值	61.91	187.98	104.40
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与 D-GalN/LPS 组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; 与大黄素 +D-GalN/LPS 组比较, <sup>c</sup> $P<0.05$



A: 自噬 Beclin1、LC3- II 蛋白表达水平; B: LC3- II /GAPDH 灰度比值; C: Beclin1/GAPDH 灰度比值; 1: 对照组; 2: 大黄素组; 3: D-GalN/LPS 组; 4: 大黄素 + D-GalN/LPS 组; 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 D-GalN/LPS 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

图 3 各组小鼠肝组织 LC3- II 和 Beclin1 蛋白表达水平 ( $n=8$ )

Fig 3 Expression of LC3-II and Beclin1 protein in liver tissue of mice in each group ( $n=8$ )

转氨酶升高来改善肝脏组织病理学异常、提高动物生存率。说明大黄素对 D-GalN/LPS 诱导的急性肝损伤有一定的预防作用。

由 D-GalN 致敏的小鼠肝脏, 易被 LPS 刺激并释放大量的炎症因子, 是 D-GalN/LPS 诱导急性肝损伤模型形成剧烈炎症反应的重要特征<sup>[25]</sup>。在本研究中, 大黄素抑制 D-GalN/LPS 诱导炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的产生, 提示大黄素对 D-GalN/LPS 诱导的小鼠肝损伤具有抗炎作用。有研究表明, 大黄素抑制 LPS 诱导的巨噬细胞或急性肺损伤产生 TNF- $\alpha$ <sup>[26-27]</sup>。另外, MPO 活性的增加被认为是急性炎症病程中中性粒细胞活化和积聚的一个重要指标<sup>[28]</sup>。本研究中 MPO 的活性结果表明 D-GalN/LPS 诱导的模型组小鼠中性粒细胞浸润增多, 而大黄素干预组这一现象则有所减轻, 这与组织病理学结果一致。

自噬是一种保守过程, 通过溶酶体降解清除细胞内受损的细胞器、多余的蛋白质、氨基酸、入侵的微生物等, 对细胞的生存起着至关重要的作用<sup>[17-20]</sup>。研究发现, 自噬过程与炎症损伤的发病机制和预后有着紧密的联系<sup>[18-20]</sup>。LC3- II、Beclin1 被认为是自噬的标志性蛋白<sup>[29-31]</sup>。本研究结果显示, D-GalN/LPS 诱导的急性肝损伤小鼠肝组织内 LC3- II、Beclin1 表达水平下降, 表明细胞自噬过程受到抑制; 大黄素处理组显著上调了 LC3-II、Beclin1 表达水平, 表明大黄素激活了自噬作用。本研究中采用自噬抑制剂 3-MA 干预后, 显著阻断了大黄素对肝脏组织病理学异常的保护作用, 逆转了大黄素抑制炎症因子释放及提高生存率的有益效应。上述结果表明 D-GalN/LPS 组使自噬作用失活, 大黄素可以在 D-GalN/LPS 诱导的急性肝损伤中重新激活自噬作用。因此, 笔者推测大黄素通过恢复受损的自噬作用, 至少部分地对 D-GalN/LPS 诱导的小鼠急性肝损伤起到保护作用。

然而, 大黄素激活自噬的具体机制尚不清楚, 仍需要进一步研究。

综上所述, 本研究结果显示大黄素减轻 D-GalN/LPS 诱导的小鼠急性肝损伤, 通过减少肝脏转氨酶生成, 抑制炎症因子的释放, 改善肝组织病理学损伤, 提高小鼠的生存率; 同时伴随着肝组织中自噬相关蛋白 LC3- II、Beclin1 水平上调, 该保护效应可被自噬抑制剂 3-MA 所逆转, 表明大黄素对 D-GalN/LPS 诱导的小鼠急性肝损伤的保护机制可能与激活自噬有关。尽管大黄素激活自噬的详细机制有待进一步研究, 但在本研究结果中, 大黄素对急性肝损伤的保护作用仍显示其具有潜在的应用价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参 考 文 献

- [1] Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, et al. Acute liver failure[J]. Lancet, 2010, 376(9736): 190-201. DOI:10.1016/S0140-6736(10)60274-7.
- [2] Tadokoro T, Morishita A, Sakamoto T, et al. Galectin-9 ameliorates fulminant liver injury[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(1): 36-42. DOI:10.3892/mmr.2017.6606.
- [3] Squires JE, McKiernan P, Squires RH. Acute liver failure: an update[J]. Clin Liver Dis, 2018, 22(4): 773-805. DOI:10.1016/j.cld.2018.06.009.
- [4] Larson AM, Polson J, Fontana RJ, et al. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study[J]. Hepatology, 2005, 42(6): 1364-1372. DOI:10.1002/hep.20948.
- [5] 盛悦, 王锦权, 陶小根, 等. 川芎嗪对腺毒致急性肝损伤大鼠肝细胞线粒体膜转运功能保护作用的实验研究[J]. 中华危重病急救医学, 2018, 30(10): 996-1000. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.10.019.
- [6] Wang HJ, Chen LY, Zhang XY, et al. Kaempferol protects mice from d-GalN/LPS-induced acute liver failure by regulating the ER stress-Grp78-CHOP signaling pathway[J]. Biomedicine Pharmacother, 2019, 111: 468-475. DOI:10.1016/j.biopha.2018.12.105.
- [7] 谢国旗, 蒋建新, 陈永华, 等. 内毒素致急性肝损伤机制的实验

- 研究[J]. 中华急诊医学杂志, 2002, 11(1): 6-9. DOI:10.3760/j.issn.1671-0282.2002.01.002.
- [8] Zhang Z, Tian L, Jiang K. Propofol attenuates inflammatory response and apoptosis to protect d-galactosamine/lipopolysaccharide induced acute liver injury via regulating TLR4/NF- $\kappa$ B/NLRP3 pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 77: 105974. DOI:10.1016/j.intimp.2019.105974.
- [9] Dong X, Fu J, Yin XB, et al. Emodin: a review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics[J]. *Phytother Res*, 2016, 30(8): 1207-1218. DOI:10.1002/ptr.5631.
- [10] 雍陟, 江智军, 章美元, 等. 大黄素对脓毒症小鼠肠道 microRNA 表达的调控作用[J]. 中华急诊医学杂志, 2019, 28(11): 1366-1372. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2019.11.007.
- [11] Li ZB, Lin YK, Zhang SH, et al. Emodin regulates neutrophil phenotypes to prevent hypercoagulation and lung carcinogenesis[J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 90. DOI:10.1186/s12967-019-1838-y.
- [12] Liu Y, Chen XL, Qiu MC, et al. Emodin ameliorates ethanol-induced fatty liver injury in mice[J]. *Pharmacology*, 2014, 94(1/2): 71-77. DOI:10.1159/000363413.
- [13] Liu F, Zhang J, Qian JM, et al. Emodin alleviates CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis by suppressing epithelial-mesenchymal transition and transforming growth factor- $\beta$  1 in rats[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(3): 3262-3270. DOI:10.3892/mmr.2018.9324.
- [14] Yang Z, Zhou E, Wei D, et al. Emodin inhibits LPS-induced inflammatory response by activating PPAR- $\gamma$  in mouse mammary epithelial cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 21(2): 354-360. DOI:10.1016/j.intimp.2014.05.019.
- [15] 尹超, 郭鸿. 小肠灌注大黄制剂对脓症患者免疫功能的影响[J]. 解放军医学杂志, 2015, 40(12): 1011-1014. DOI:10.11855/j.issn.0577-7402.2015.12.15.
- [16] 高磊, 黄野, 陈亚峰, 等. 大黄素和大承气汤治疗重症急性胰腺炎小鼠对比研究[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(5): 1025-1028. DOI:10.3969/j.issn.1008-0805.2020.05.001.
- [17] Fan K, Lin L, Ai Q, et al. Lipopolysaccharide-induced dephosphorylation of AMPK-activated protein kinase potentiates inflammatory injury via repression of ULK1-dependent autophagy[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1464. DOI:10.3389/fimmu.2018.01464.
- [18] Dong W, He B, Qian H, et al. RAB26-dependent autophagy protects adherens junctional integrity in acute lung injury[J]. *Autophagy*, 2018, 14(10): 1677-1692. DOI:10.1080/15548627.2018.1476811.
- [19] Ho J, Yu J, Wong SH, et al. Autophagy in sepsis: Degradation into exhaustion?[J]. *Autophagy*, 2016, 12(7): 1073-1082. DOI:10.1080/15548627.2016.1179410.
- [20] Hu Y, Liu J, Wu YF, et al. mTOR and autophagy in regulation of acute lung injury: a review and perspective[J]. *Microbes Infect*, 2014, 16(9): 727-734. DOI:10.1016/j.micinf.2014.07.005.
- [21] 王玉, 杨雪, 夏鹏飞, 等. 大黄化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中草药, 2019, 50(19): 4821-4837. DOI:10.7501/j.issn.0253-2670.2019.19.033.
- [22] Iwanowycz S, Wang J, Altomare D, et al. Emodin bidirectionally modulates macrophage polarization and epigenetically regulates macrophage memory[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(22): 11491-11503. DOI:10.1074/jbc.m115.702092.
- [23] 王亦君, 冯舒涵, 程锦堂, 等. 大黄蒽醌类化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(13):227-234. DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.20181020.
- [24] Kim YS, Lee YM, Oh TI, et al. Emodin sensitizes hepatocellular carcinoma cells to the anti-cancer effect of sorafenib through suppression of cholesterol metabolism[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10): 3127. DOI:10.3390/ijms19103127.
- [25] Malagarie-Cazenave S, Ségué B, Lévêque S, et al. Role of FAN in tumor necrosis factor- $\alpha$  and lipopolysaccharide-induced interleukin-6 secretion and lethality in D-galactosamine-sensitized mice[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(18): 18648-18655. DOI:10.1074/jbc.m314294200.
- [26] Song YD, Li XZ, Wu YX, et al. Emodin alleviates alternatively activated macrophage and asthmatic airway inflammation in a murine asthma model[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(8): 1317-1325. DOI:10.1038/aps.2017.147.
- [27] Xiao M, Zhu T, Zhang W, et al. Emodin ameliorates LPS-induced acute lung injury, involving the inactivation of NF- $\kappa$ B in mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(11): 19355-19368. DOI:10.3390/ijms151119355.
- [28] Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2018, 640: 47-52. DOI:10.1016/j.abb.2018.01.004.
- [29] Aparicio IM, Martin Muñoz P, Salido GM, et al. The autophagy-related protein LC3 is processed in stallion spermatozoa during short- and long-term storage and the related stressful conditions[J]. *Animal*, 2016, 10(7): 1182-1191. DOI:10.1017/S1751731116000240.
- [30] Maejima Y, Isobe M, Sadoshima J. Regulation of autophagy by Beclin 1 in the heart[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 95: 19-25. DOI:10.1016/j.yjmcc.2015.10.032.
- [31] 孙波, 张晓晓, 刘廪, 等. 齐墩果酸对糖尿病大鼠心肌保护作用及机制研究[J]. 中华急诊医学杂志, 2020, 29(9): 1191-1195. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2020.09.010.

( 收稿日期 : 2020-09-04 )

( 本文编辑 : 郑辛甜 )