

- [30] BANIYA R, UPADHAYA S, KHAN J, et al. Carbon dioxide versus air insufflation in gastric endoscopic submucosal dissection: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Clin Endosc, 2017, 50(5):464-472.
- [31] SUZUKI T, HARA T, KITAGAWA Y, et al. Usefulness of IT knife nano for endoscopic submucosal dissection of large colorectal lesions[J]. Acta Gastroenterol Belg, 2016, 79(2):186-190.
- [32] 刘吉福, 陆晓华, 王犀点. 氩等离子体凝固技术的临床应用综述[J]. 中国医疗设备, 2020, 35(11):162-165.
- [33] XIA M, ZHOU Y, YU J, et al. Short-term outcomes of traction-assisted versus conventional endoscopic submucosal dissection for superficial gastrointestinal neoplasms: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled studies[J]. World J Surg Oncol, 2019, 17(1):94.
- [34] 李冰, 周平红, 姚礼庆, 等. 内镜黏膜下剥离治疗结直肠黏膜病变术后肛管引流减压疗效分析[J]. 中国实用外科杂志, 2017, 37(7):802-805.
- [35] 徐亮. 消化道穿孔的内镜下处理[J/CD]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(91):17998-18000. DOI: 10.3877/j.issn.2095-8242.2017.91.098.
- [36] WINDER JS, PAULI EM. Comprehensive management of full-thickness luminal defects: The next frontier of gastrointestinal endoscopy[J]. World J Gastrointest Endosc, 2015, 7(8):758-768.
- [37] 斯铁凡. 医源性胃穿孔中应用内镜下闭合技术的治疗效果与安全性分析[J]. 当代医学, 2019, 25(17):18-20.
- [38] 郭佳. 浅谈荷包缝合技术在消化内镜中的临床应用价值[J/CD]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(56):35. DOI: 10.3877/j.issn.2095-8242.2018.56.028.
- [39] NAGAMI Y, FUKUNAGA S, KANAMORI A, et al. Endoscopic closure using polyglycolic acid sheets for delayed perforation after colonic endoscopic submucosal dissection [J/OL]. Endoscopy, 2020, 52(1):e11-e12. DOI: 10.1055/a-0978-4501.

(收稿日期:2021-07-19,修回日期:2021-09-01)

引用本文: 龚宇, 杨文健, 李鸣一. 毛兰素通过 JNK/c-Jun 信号通路对 2 型糖尿病大鼠肝脏损伤的保护作用机制研究[J]. 安徽医药, 2023, 27(4):663-668. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2023.04.007.

◇ 药学研究 ◇



毛兰素通过 JNK/c-Jun 信号通路对 2 型糖尿病大鼠肝脏损伤的保护作用机制研究

龚宇, 杨文健, 李鸣一

作者单位: 襄阳市第一人民医院内分泌科, 湖北 襄阳 441000

通信作者: 李鸣一, 男, 副主任医师, 研究方向为内分泌, Email: gg669p@163.com

基金项目: 湖北医药学院资助项目(23)

摘要: **目的** 基于 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)/c-Jun 信号通路对氧化应激反应的调控作用, 研究毛兰素对 2 型糖尿病大鼠肝脏损伤的保护作用。**方法** 于 2021 年 10 月至 2022 年 2 月腹腔注射链脲佐菌素构建糖尿病大鼠模型, 将造模成功大鼠分为模型组、毛兰素低剂量组(10 mg/kg)、毛兰素高剂量组(40 mg/kg), 及罗格列酮组(1.25 mg/kg)、毛兰素(40 mg/kg)+JNK 激活组(5 mg/kg), 每组 10 只, 另取正常饲养大鼠 10 只作为对照组。连续给药 6 周后, 通过血糖仪和胰岛素放射免疫分析试剂盒检测空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS)水平, 计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)及胰岛素敏感指数(ISI); 天平称取大鼠体质量和肝质量, 计算肝脏指数; 试剂盒检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性及丙二醛(MDA)含量; HE 染色观察肝脏组织病理学变化; western blotting 法检测肝脏组织中 JNK/c-Jun 信号通路相关蛋白表达。**结果** 与对照组相比, 模型组肝脏指数[(4.26±0.12)g/100 g 比 (2.24±0.09)g/100 g]、FBG[(21.49±1.78)mmol/L 比 (5.14±0.45)mmol/L]、FINS[(80.17±6.38)mmol/L 比 (22.35±2.04)mmol/L]、HOMA-IR[(76.46±6.56)比 (5.11±1.12)]、ALT[(138.71±10.21)U/L 比 (70.29±5.54)U/L]和 AST 活性[(77.21±5.08)U/L 比 (40.38±3.27)U/L]、MDA 含量[(13.45±1.34)nmol/mg prot 比 (3.72±0.87)nmol/mg prot]、JNK/c-Jun 信号通路相关蛋白表达均明显升高($P<0.05$), 体质量、ISI[(-7.45±0.18)比 (-4.74±0.11)]、SOD[(100.79±11.22)U/mg prot 比 (223.46±19.86)U/mg prot]和 GSH-Px 活性[(24.42±1.74)U/mg prot 比 (56.79±3.18)U/mg prot]明显降低($P<0.05$), 且肝脏组织病理损伤较为严重; 与模型组相比, 毛兰素低剂量组、毛兰素高剂量组和罗格列酮组肝脏指数、FBG、FINS、HOMA-IR、ALT 和 AST 活性、MDA 含量、JNK/c-Jun 信号通路相关蛋白表达均明显降低($P<0.05$), 体质量、ISI、SOD 和 GSH-Px 活性明显升高($P<0.05$), 减轻肝脏损伤程度; 与毛兰素高剂量组相比, 毛兰素低剂量组、毛兰素+JNK 激活组肝脏指数、FBG、FINS、HOMA-IR、ALT 和 AST 活性、MDA 含量、JNK/c-Jun 信号通路相关蛋白表达均明显升高($P<0.05$), 体质量、ISI、SOD 和 GSH-Px 活性明显降低($P<0.05$), 肝脏损伤恢复缓慢。**结论** 毛兰素可通过调控 JNK/c-Jun 信号通路, 抑制 JNK/c-Jun 通路蛋白表达, 从而缓解氧化应激反应, 改善糖尿病大鼠肝脏损伤。

关键词: 毛兰素; 糖尿病; 原癌基因蛋白质 c-jun; 肝脏损伤; c-Jun 氨基末端激酶; 氧化应激; 大鼠, Sprague-Dawley

Study on the protective mechanism of Erianin on liver injury in type 2 diabetic rats through the JNK/c-Jun signaling pathway

GONG Yu, YANG Wenjian, LI Mingyi

Author Affiliation: Endocrine Department, Xiangyang First People's Hospital, Xiangyang, Hubei 441000, China

Abstract: **Objective** Based on the regulatory effect of the c-Jun N-terminal kinase (JNK)/c-Jun signaling pathway on the oxidative stress response, we studied the protective effect of Erianin on liver injury in type 2 diabetic rats. **Methods** The diabetic rat model was constructed by intraperitoneal injection of streptozotocin from October 2021 to February 2022, and the successfully modeled rats were divided into the model group, Erianin low-dose group (10 mg/kg), Erianin high-dose group (40 mg/kg), rosiglitazone group (1.25 mg/kg), and Erianin (40 mg/kg) + JNK activator (5 mg/kg) group, with 10 rats in each group. After 6 weeks of continuous administration, the levels of fasting blood glucose (FBG) and fasting insulin (FINS) were detected by a glucose meter and insulin radioimmunoassay kit, and the insulin resistance index (HOMA-IR) and insulin sensitivity index (ISI) were calculated; the body weight and liver weight of rats were weighed with a balance, and the liver index was calculated; the kit was used to detect the contents of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total superoxide dismutase (T-SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and malondialdehyde (MDA). HE staining was used to observe the pathological changes in the liver. Western Blotting was used to detect the expression of JNK/c-Jun signaling pathway-related proteins in liver tissues. **Results** Compared with the control group, the liver index [(4.26±0.12) g/100 g vs. (2.24±0.09) g/100 g], FBG [(21.49±1.78) mmol/L vs. (5.14±0.45) mmol/L], FINS [(80.17±6.38) mmol/L vs. (22.35±2.04) mmol/L], HOMA-IR [(76.46±6.56) vs. (5.11±1.12)], ALT [(138.71±10.21) U/L vs. (70.29±5.54) U/L] and AST activity [(77.21±5.08) U/L vs. (40.38±3.27) U/L], and MDA content [(13.45±1.34) nmol/mg prot vs. (3.72±0.87) nmol/mg prot], and JNK/c-Jun signaling pathway-related protein expression in the model group were significantly higher ($P < 0.05$), the body weight, ISI [(-7.45±0.18) vs. (-4.74±0.11)], SOD [(100.79±11.22) U/mg prot vs. (223.46±19.86) U/mg prot] and GSH-Px activity [(24.42±1.74) U/mg prot vs. (56.79±3.18) U/mg prot] were significantly lower ($P < 0.05$), and liver tissue pathological damage was more severe. Compared with the model group, the liver index, FBG, FINS, HOMA-IR, ALT and AST activities, MDA content, and JNK/c-Jun signaling pathway-related protein expression in the Erianin low-dose group, Erianin high-dose group, and rosiglitazone group were significantly lower ($P < 0.05$), and the body weight, ISI, SOD and GSH-Px activities were significantly higher ($P < 0.05$), reducing the degree of liver injury. Compared with the Erianin high-dose group, the liver index, FBG, FINS, HOMA-IR, ALT and AST activities, MDA content, and JNK/c-Jun signaling pathway-related protein expression in the Erianin low dose group and Erianin + JNK activator group were significantly higher ($P < 0.05$), the body weight, ISI, SOD and GSH-Px activities were significantly lower ($P < 0.05$), and slow recovery from liver injury was observed. **Conclusion** Erianin ameliorates oxidative stress and improves liver injury in diabetic rats by regulating the JNK/c-Jun signaling pathway and inhibiting the JNK/c-Jun pathway protein expression.

Key words: Erianin; Diabetes; Proto-oncogene proteins c-jun; Liver damage; c-Jun N-terminal kinase; Oxidative stress; Rat, Sprague-Dawley

糖尿病是一种代谢紊乱性疾病,其主要特征是机体血糖不能正常代谢,引发慢性高血糖,导致肝、肾、心脏等组织器官出现损伤病变,影响正常生理功能。肝脏损伤是引起糖尿病病人死亡的一个重要原因,研究表明,糖尿病肝脏损伤病因较为复杂,氧化应激和高血糖就是两个关键致病因素,开发针对性克服氧化应激、高血糖从而缓解肝损伤的药物以治疗糖尿病肝脏损伤成为当前研究的重点^[1-2]。

c-Jun 氨基末端激酶(JNK)又称应激活化蛋白激酶,是 MAPK 信号通路中的一条重要分支,在细胞生长、凋亡、应激等多种生理病理过程中发挥重要作用^[3-4]。c-Jun 蛋白属于活化蛋白-1 转录复合物,受多种蛋白激酶调控,同样在细胞凋亡、应激等过程中发挥调控作用。JNK/c-Jun 信号通路在氧化应激反应过程中发挥重要作用,能够产生包括活性氧、一氧化氮在内的多种自由基,促进氧化应激和炎症反应的发

生与发展^[5-6],JNK/c-Jun 信号通路很可能通过介导氧化应激反应,参与调控糖尿病引发的肝脏损伤。

近年来利用植物提取物等有效成分参与治疗疾病的案例逐渐增多,毛兰素是从石斛中提取分离的一种联苄类化合物。研究表明,毛兰素具有抑菌、抗病毒、抗炎、抗氧化、抗肿瘤等生物活性,以毛兰素为主要成分的石斛也被证实对于糖尿病具有一定的治疗效果^[7-8]。推测毛兰素可通过调节氧化应激及高血糖,从而缓解糖尿病。因此,本研究通过构建 2 型糖尿病大鼠模型,探讨毛兰素对糖尿病大鼠肝脏损伤的保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 于 2021 年 10 月至 2022 年 2 月 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量(230±25)g,由常州卡文斯实验动物有限公司提供,许可证号 SCXK(苏)2016-0010。饲养环境:室温 20~26℃、湿度 40%~70%、光

照条件 12 h/12 h, 适应 7 d 后实验, 期间饮食正常。本研究符合一般动物实验伦理学原则。

1.2 主要试剂与仪器 毛兰素、羧甲基纤维素钠、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)检测试剂盒、丙氨酸氨基转移酶(ALT)检测试剂盒、大鼠空腹胰岛素(FINS)ELISA 试剂盒购于北京伊塔生物科技有限公司(YT62752、YT2454、SY6346、SY6338、YK-08954); 罗格列酮购于北京康瑞纳生物科技有限公司(BP6157); 链脲佐菌素购于北京索莱宝科技有限公司(S8050); 丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司(S0131M、S0101M、S0056); 兔抗 JNK1 (ab199380)、兔抗 p-JNK1 (ab47337)、兔抗 c-Jun (ab40766)、兔抗 p-c-Jun (ab32385)、兔抗 β -actin (ab8227)、山羊抗兔 IgG (ab6721) 购于 Abcam 公司。血糖仪(上海聚慕, 三诺 GA-3 型); 显微镜(日本 Nikon, Ti-S); 光学显微镜(上海豫光仪器厂); 凝胶成像仪(苏州阿尔法生物实验器材, Alpha View)。

1.3 糖尿病大鼠模型构建 大鼠喂养正常饲料 7 d, 适应环境后, 开始进行为期 4 周高脂高糖饲料喂养。结束后, 禁食 12 h, 将 1% 链脲佐菌素溶液(采用柠檬酸缓冲液溶解链脲佐菌素)注入大鼠腹腔(30 mg/kg)。给药 3 d 后, 禁食 12 h, 静脉取血检测空腹血糖(FBG)水平, $\text{FBG} \geq 11.1 \text{ mmol/L}$ 表明模型构建成功^[9]。

1.4 分组及给药 将造模完成大鼠进行分组, 包括: 模型组、毛兰素低剂量组、毛兰素高剂量组、罗格列酮组和毛兰素+JNK 激活组, 每组 10 只。另取正常饲养大鼠 10 只, 作为对照组。毛兰素和罗格列酮采用 0.5% 的羧甲基纤维素钠溶液进行溶解。毛兰素低剂量、高剂量组分别灌胃 10、40 mg/kg 毛兰素溶液; 罗格列酮组灌胃 1.25 mg/kg 罗格列酮溶液^[9], 毛兰素+JNK 激活组灌胃 40 mg/kg 毛兰素溶液的同时腹腔注射 JNK 激活剂 Anisomycin 5 mg/kg^[10], 对照组和模型组灌胃等体积羧甲基纤维素钠溶液, 1 次/天, 连续给药 6 周。

1.5 样品采集 最后一次给药, 大鼠空腹 12 h 后进行样品采集。尾静脉取血检测大鼠 FBG; 将大鼠麻醉腹腔主动脉取血, 收集在离心管中, 放入离心机 4 °C、1 500 r/min 离心 15 min 后取血清, 放置在 -20 °C 冷冻备用。将大鼠处死, 打开腹腔, 取出肝脏组织置于冰上。取肝左叶 8 mm×8 mm 大小组织在 10% 中性福尔马林溶液中固定, 用于病理学检测; 剩余部分肝脏组织采用 PBS (9 mL) 制备组织匀浆, 部分肝脏组织 -80 °C 冷冻备用。

1.6 各组大鼠 FBG、ISI、FINS 和胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)检测 使用血糖仪检测大鼠 FBG 水

平; 使用大鼠 FINS ELISA 试剂盒检测大鼠 FINS 水平, 检测过程中严格按照操作步骤进行; 根据 HOMA-IR 公式: $(\text{FINS} \times \text{FBG} / 22.5)$ 及胰岛素敏感指数 (ISI) 公式: $\text{LN}[1/(\text{FBG} \times \text{FINS})]$, 分别对应求出 HOMA-IR 和 ISI。

1.7 各组大鼠体质量、肝质量、肝脏指数和 ALT、AST 活性检测 给药完成后大鼠禁食 12 h, 称量体质量进行记录。处死后取出肝脏组织称重并记录。之后计算肝脏指数: $[\text{肝质量}(\text{g}) / \text{体质量}(\text{g})]$ 。取出冷冻血清, 快速解冻后, 进行 ALT、AST 活性检测, 具体操作步骤严格按照试剂盒要求。

1.8 各组大鼠肝脏组织病理学变化检测 取在福尔马林中固定的肝脏组织, 使用乙醇脱水、石蜡包埋、制成 4 μm 厚的切片, HE 染色后显微镜下观察。

1.9 各组大鼠肝脏组织中 MDA 含量、T-SOD 和 GSH-Px 活性测定 将肝脏组织匀浆离心后取上清液, 进行 MDA 含量、T-SOD 和 GSH-Px 活性检测。具体操作步骤严格按照 MDA、T-SOD 和 GSH-Px 检测试剂盒要求进行。

1.10 各组大鼠肝脏组织中 JNK/c-Jun 信号通路相关蛋白表达检测 取出冷冻保存的肝脏组织, 在液氮中研磨, 使用 RIPA 试剂盒提取总蛋白, 根据 BCA 试剂盒测定蛋白的浓度, 计算上样量。SDS-PAGE 凝胶电泳后, 半干转印至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上; 5% 脱脂奶粉封闭 1 h; 分别加入兔抗 JNK1、p-JNK1、c-Jun、p-c-Jun 和 β -actin (1:500), 4 °C 孵育过夜; 加入二抗 (1:5 000), 室温孵育 1 h。经化学发光法进行检测, Tanon 软件拍摄图像并进行半定量分析。

1.11 统计学方法 采用软件 SPSS 22.0 对数据进行统计学分析, 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 进行描述, 多组间比较行单因素方差分析, 进一步的组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 FBG、ISI、FINS 和 HOMA-IR 情况 与对照组相比, 模型组大鼠 ISI 明显降低 ($P < 0.05$), FBG、FINS 和 HOMA-IR 明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 毛兰素低剂量组、毛兰素高剂量组、罗格列酮组大鼠 ISI 明显升高 ($P < 0.05$), FBG、FINS 和 HOMA-IR 明显降低 ($P < 0.05$)。与毛兰素高剂量组相比, 毛兰素低剂量组、毛兰素+JNK 激活组大鼠 ISI 明显降低 ($P < 0.05$), FBG、FINS 和 HOMA-IR 明显升高 ($P < 0.05$)。罗格列酮组的作用效果与毛兰素高剂量组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 各组大鼠体质量、肝脏指数、血清中 AST、ALT 活性 与对照组相比, 模型组大鼠体质量明显减轻 ($P < 0.05$), 肝脏指数、AST、ALT 活性明显升高 ($P <$

表1 各组大鼠FBG、ISI、FINS和HOMA-IR比较 $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	FBG/(mmol/L)	ISI	FINS/(nmol/L)	HOMA-IR
对照组	10	5.14±0.45	-4.74±0.11	22.35±2.04	5.11±1.12
模型组	10	21.49±1.78 ^①	-7.45±0.18 ^①	80.17±6.38 ^①	76.46±6.56 ^①
毛兰素低剂量组	10	13.05±1.20 ^{①②③}	-6.35±0.07 ^{①②③}	44.12±3.06 ^{①②③}	25.59±2.03 ^{①②③}
毛兰素高剂量组	10	9.36±1.13 ^{①②}	-5.50±0.09 ^{①②}	28.24±2.53 ^{①②}	10.92±1.41 ^{①②}
罗格列酮组	10	9.92±0.95 ^{①②}	-5.52±0.10 ^{①②}	28.29±2.16 ^{①②}	11.15±1.28 ^{①②}
毛兰素+JNK激活组	10	16.62±1.09 ^{①②③}	-6.91±0.12 ^{①②③}	61.77±3.21 ^{①②③}	45.62±3.49 ^{①②③}
F值		247.57	744.95	410.76	701.97
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:FBG为空腹血糖,ISI为胰岛素敏感指数,FINS为空腹胰岛素,HOMA-IR为胰岛素抵抗指数。

①与对照组相比, $P<0.05$ 。②与模型组相比, $P<0.05$ 。③与毛兰素高剂量组相比, $P<0.05$ 。

0.05)。与模型组相比,毛兰素低剂量组、毛兰素高剂量组、罗格列酮组大鼠体质量明显增加($P<0.05$),肝脏指数、AST、ALT活性明显降低($P<0.05$)。与毛兰素高剂量组相比,毛兰素低剂量组、毛兰素+JNK激活组大鼠体质量明显降低($P<0.05$),肝脏指数、AST、ALT活性明显增加($P<0.05$)。罗格列酮组在大鼠体质量、肝脏指数及AST、ALT活性与毛兰素高剂量组的差异无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

2.3 各组大鼠肝脏组织病理学变化 对照组大鼠肝细胞排列规则整齐,未观察到炎性细胞浸润或明显变性、坏死的细胞。模型组大鼠肝细胞排列凌乱无规则,局部观察到有炎性细胞浸润及细胞变性、坏死。与模型组相比,毛兰素低剂量组、毛兰素高剂量组大鼠肝脏组织中肝细胞排列整齐,水肿、空泡得到改善,尤其是毛兰素高剂量组,肝脏组织病理变化改善较为明显。罗格列酮组对肝脏组织作用效果与毛兰素高剂量组相类似。与毛兰素高剂量组相比,毛兰素+JNK激活组肝脏组织恢复缓慢,仍有大量炎性细胞浸润。见图1。

2.4 各组大鼠肝脏组织中MDA含量、T-SOD和GSH-Px活性 与对照组相比,模型组大鼠肝脏组织中MDA含量明显增加($P<0.05$),T-SOD和GSH-Px活性明显降低($P<0.05$)。与模型组相比,毛兰素

低剂量组、毛兰素高剂量组、罗格列酮组能够明显降低MDA含量($P<0.05$),提高T-SOD和GSH-Px活性($P<0.05$)。与毛兰素高剂量组相比,毛兰素低剂量组、毛兰素+JNK激活组大鼠肝脏组织中MDA含量明显增加($P<0.05$),T-SOD和GSH-Px活性明显降低($P<0.05$)。罗格列酮对MDA、T-SOD和GSH-Px的作用效果与毛兰素高剂量组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表3。

2.5 各组大鼠肝脏组织中JNK/c-Jun信号通路相关蛋白表达水平 与对照组相比,模型组大鼠肝脏组织中JNK1、p-JNK1、c-Jun和p-c-Jun蛋白表达均明显升高($P<0.05$)。与模型组相比,毛兰素低剂量组、毛兰素高剂量组、罗格列酮组能够明显抑制大鼠肝脏组织中JNK、p-JNK1、c-Jun和p-c-Jun蛋白表达升高($P<0.05$)。与毛兰素高剂量组相比,毛兰素低剂量组、毛兰素+JNK激活组大鼠肝脏组织中JNK1、p-JNK1、c-Jun和p-c-Jun蛋白表达均明显升高($P<0.05$)。罗格列酮组与毛兰素高剂量组的JNK、p-JNK1、c-Jun和p-c-Jun蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。见图2,表4。

3 讨论

肝脏作为糖代谢的主要器官,容易受到糖尿病影响造成肝脏损伤;肝脏损伤会导致正常糖代谢紊

表2 各组大鼠体质量、肝脏指数、血清中AST、ALT活性比较 $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	体质量/g	肝脏指数/(g/100g)	AST/(U/L)	ALT/(U/L)
对照组	10	443.32±23.27	2.24±0.09	40.38±3.27	70.29±5.54
模型组	10	338.46±20.19 ^①	4.26±0.12 ^①	77.21±5.08 ^①	138.71±10.21 ^①
毛兰素低剂量组	10	391.78±23.82 ^{①②③}	3.14±0.10 ^{①②③}	58.51±5.96 ^{①②③}	98.20±8.76 ^{①②③}
毛兰素高剂量组	10	423.91±25.68 ^{①②}	2.47±0.07 ^{①②}	46.54±3.17 ^{①②}	76.13±7.12 ^{①②}
罗格列酮组	10	421.98±24.10 ^{①②}	2.56±0.08 ^{①②}	48.23±4.29 ^{①②}	75.35±6.52 ^{①②}
毛兰素+JNK激活组	10	371.52±22.16 ^{①②③}	3.69±0.08 ^{①②③}	65.82±5.84 ^{①②③}	114.66±8.48 ^{①②③}
F值		28.02	744.34	84.26	116.51
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:AST为谷草转氨酶,ALT为谷丙转氨酶。

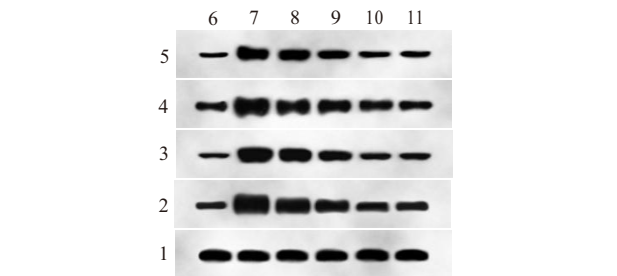
①与对照组相比, $P<0.05$ 。②与模型组相比, $P<0.05$ 。③与毛兰素高剂量组相比, $P<0.05$ 。

表3 各组大鼠肝脏组织MDA含量、T-SOD和GSH-Px活性比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	MDA/(nmol/mg)	T-SOD/(U/mg)	GSH-Px/(U/mg)
对照组	10	3.72±0.87	223.46±19.86	56.79±3.18
模型组	10	13.45±1.34 ^①	100.79±11.22 ^①	24.42±1.74 ^①
毛兰素低剂量组	10	7.71±0.96 ^{①②③}	175.27±15.34 ^{①②③}	41.74±2.19 ^{①②③}
毛兰素高剂量组	10	4.91±0.71 ^{①②}	212.28±17.19 ^{①②}	53.48±3.05 ^{①②}
罗格列酮组	10	5.15±0.62 ^{①②}	208.41±15.35 ^{①②}	52.27±2.47 ^{①②}
毛兰素+JNK激活组	10	10.63±1.10 ^{①②③}	136.35±10.48 ^{①②③}	32.53±2.32 ^{①②③}
F值		154.42	101.81	260.51
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:MDA为丙二醛,T-SOD为总超氧化物歧化酶,GSH-Px为谷胱甘肽过氧化物酶。

①与对照组相比, $P<0.05$ 。②与模型组相比, $P<0.05$ 。③与毛兰素高剂量组相比, $P<0.05$ 。



注:1— β -肌动蛋白(β -actin);2—c-Jun氨基末端激酶1(JNK1);3—磷酸化c-Jun氨基末端激酶1(p-JNK1);4—c-Jun氨基末端激酶(c-Jun);5—磷酸化c-Jun氨基末端激酶(p-c-Jun);6—对照组;7—模型组;8—毛兰素+JNK激活组;9—毛兰素低剂量组;10—毛兰素高剂量组;11—罗格列酮组。

图2 各组大鼠肝脏组织中JNK/c-Jun信号通路相关蛋白表达情况

乱,引起机体血糖升高;而持续高血糖将会促进机体产生大量活性氧,促进氧化应激反应的发生发展,加重肝脏损伤程度,形成恶性循环^[11]。因此,降低机体血糖浓度,减轻机体氧化应激水平,是改善或缓解肝脏损伤的一个有效解决方法^[12]。糖尿病引发的氧化应激过程中,高血糖会导致活性氧大量产生,破坏脂质、蛋白质等生物大分子,引起细胞损伤和凋亡。MDA是活性氧与脂质反应产生的一种有毒物质,也是氧化应激反应的一个主要标志物;SOD和GSH-Px作为机体内源性抗氧化系统重要成

员,能够清除机体包括活性氧在内的多种自由基,维持机体氧化与抗氧化平衡;因此,MDA含量、SOD和GSH-Px活性能够反映氧化应激程度^[13-15]。本研究结果显示,模型组大鼠血糖含量和胰岛素抵抗明显升高,肝脏组织中MDA含量明显升高,SOD、GSH-Px活性明显降低,胰岛素敏感程度明显降低,表明模型大鼠具有高血糖、氧化应激症状;而与模型组相比,毛兰素低剂量组、毛兰素高剂量组、罗格列酮组能够降低大鼠血糖和胰岛素抵抗,提高大鼠胰岛素敏感程度,减少活性氧产生,抑制氧化应激反应。这提示,毛兰素通过调控大鼠对胰岛素的利用来降低血糖,减少活性氧大量产生,从而抑制氧化应激反应的发生。

ALT和AST活性增加是糖尿病大鼠肝脏损伤的一个重要标识。ALT和AST活性增加,一方面会导致肝脏组织对胰岛素敏感性降低,另一方面会引起大鼠体质量下降、肝质量增加、肝组织损伤加重,影响大鼠正常机体生理功能^[16-17]。本研究结果显示,模型组大鼠肝脏指数、ALT和AST活性明显增加,体质量明显降低;而与模型组相比,毛兰素低剂量组、毛兰素高剂量组、罗格列酮组能够降低大鼠肝脏指数及ALT和AST活性,增加大鼠体质量。这提示,毛兰素可能通过降低ALT和AST活性,来减轻肝脏

表4 各组大鼠肝脏组织中JNK/c-Jun信号通路相关蛋白表达水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	JNK1	p-JNK1	c-Jun	p-c-Jun
对照组	10	0.49±0.06	0.37±0.03	0.71±0.09	0.41±0.02
模型组	10	1.98±0.12 ^①	1.58±0.09 ^①	1.96±0.15 ^①	1.34±0.07 ^①
毛兰素低剂量组	10	1.19±0.14 ^{①②③}	0.96±0.07 ^{①②③}	1.27±0.13 ^{①②③}	0.76±0.08 ^{①②③}
毛兰素高剂量组	10	0.72±0.09 ^{①②}	0.45±0.05 ^{①②}	0.86±0.08 ^{①②}	0.42±0.05 ^{①②}
罗格列酮组	10	0.68±0.08 ^{①②}	0.47±0.03 ^{①②}	0.80±0.09 ^{①②}	0.44±0.04 ^{①②}
毛兰素+JNK激活组	10	1.58±0.13 ^{①②③}	1.27±0.10 ^{①②③}	1.61±0.13 ^{①②③}	1.05±0.06 ^{①②③}
F值		296.61	552.18	192.59	468.70
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:JNK1为c-Jun氨基末端激酶1,p-JNK1为磷酸化c-Jun氨基末端激酶1,c-Jun为c-Jun氨基末端激酶,p-c-Jun为磷酸化c-Jun氨基末端激酶。

①与对照组相比, $P<0.05$ 。②与模型组相比, $P<0.05$ 。③与毛兰素高剂量组相比, $P<0.05$ 。

重量和损伤程度,帮助恢复肝脏组织正常功能。

研究表明,JNK/c-Jun 信号通路可被氧化应激反激活^[18]。活化的JNK会向核内转移,促使c-Jun磷酸化,经过一系列反应后引起下游信号通路激活。JNK/c-Jun 信号通路参与糖尿病的发生与发展,JNK通路活化后能够抑制胰岛素分泌,同时增强胰岛素抵抗,导致机体血糖持续高表达,氧化应激反应随之加强^[19-20]。本研究结果显示,模型组大鼠JNK/c-Jun通路相关蛋白JNK1、p-JNK1、c-Jun和p-c-Jun表达明显升高;与模型组相比,毛兰素低剂量组、毛兰素高剂量组、罗格列酮组能够抑制JNK1、p-JNK1、c-Jun和p-c-Jun蛋白表达升高。这提示,毛兰素可能通过抑制JNK/c-Jun信号通路的激活,阻碍其引起的胰岛素分泌减少及胰岛素抵抗,从而降低机体高血糖及氧化应激反应,发挥对糖尿病大鼠肝脏损伤的保护作用。为进一步证实,本研究在毛兰素作用的同时激活JNK,发现JNK1、p-JNK1、c-Jun和p-c-Jun蛋白表达升高,同时大鼠肝脏指数及ALT和AST活性、血糖含量和胰岛素抵抗明显升高,肝脏组织中MDA含量明显升高,SOD、GSH-Px活性、胰岛素敏感程度明显降低,进一步验证相关推测。

综上所述,毛兰素可通过调控JNK/c-Jun信号通路,抑制相关蛋白表达,从而降低ALT和AST活性,抑制氧化应激反应,减轻肝脏组织病理学损伤来发挥对糖尿病大鼠肝脏损伤的保护作用,是否有其他通路间接参与调控相关疾病,还需进一步的实验加以证明。

(本文图1见插图4-1)

参考文献

- [1] EKTA, GUPTA M, KAUR A, et al. Pathobiological and molecular connections involved in the high fructose and high fat diet induced diabetes associated nonalcoholic fatty liver disease[J]. Inflamm Res, 2020, 69(9):851-867.
- [2] YANG XS, ZHANG PJ, ZHANG FX, et al. Protective effect of hypoglycemic granule against diabetes-induced liver injury by alleviating glycolipid metabolic disorder and oxidative stress[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(5/6):3221-3234.
- [3] DONG XF, ZHAI QH, TONG JM. Dietary choline supplementation regulated lipid profiles of egg yolk, blood, and liver and improved hepatic redox status in laying hens[J]. Poult Sci, 2019, 98(8):3304-3312.
- [4] LI MM, ZHAO H, WU JY, et al. Nobiletin protects against acute liver injury via targeting c-jun n-terminal kinase (JNK)-induced apoptosis of hepatocytes[J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(27):7112-7120.
- [5] LIU B, HOU Q, MA Y, et al. HIPK3 mediates inflammatory cytokines and oxidative stress markers in monocytes in a rat model of sepsis through the JNK/c-jun signaling pathway[J]. Inflammation, 2020, 43(3):1127-1142.
- [6] YU X, CHEN D, WANG L, et al. Wogonoside inhibits inflammatory cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated macrophage by suppressing the activation of the JNK/c-Jun signaling pathway[J]. Ann Transl Med, 2020, 8(8):532-547.
- [7] 李震, 曹奕鸥, 肖立俊, 等. 毛兰素及其衍生物抗肿瘤作用研究进展[J]. 中成药, 2019, 41(10):2442-2444.
- [8] 俞越, 李春霞, 史春. 石斛提取物与糖尿病视网膜病变相关研究进展[J]. 中国中医眼科杂志, 2021, 31(3):215-217, 223.
- [9] 邵赛聪, 周丽红, 谭梦晖, 等. 复方鱼腥草对高糖高脂联合低剂量链脲佐菌素诱导的2型糖尿病大鼠干预研究[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(6):637-641.
- [10] 李亚灵, 刘茂军, 郑霞, 等. 硫化氢通过调控JNK通路改善H型高血压大鼠心肌纤维化[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(8):1679-1682.
- [11] PETROVIC A, BOGOJEVIC D, KORAC A, et al. Oxidative stress dependent contribution of HMGB1 to the interplay between apoptosis and autophagy in diabetic rat liver[J]. J Physiol Biochem, 2017, 73(4):511-521.
- [12] 侯书鹏. 银杏内酯B通过Nrf2/HO-1通路抑制糖尿病大鼠肝损伤机制研究[J]. 陕西中医, 2021, 42(8):1005-1009.
- [13] 王小军, 廖涛. 急诊脓毒血症患者血清氧化应激指标水平与疾病预后相关性分析[J]. 陕西医学杂志, 2020, 49(10):1288-1291.
- [14] ZHANG X, FENG J, SU S, et al. Hepatoprotective effects of Camellia nitidissima aqueous ethanol extract against CCl4-induced acute liver injury in SD rats related to Nrf2 and NF-kappaB signaling[J]. Pharm Biol, 2020, 58(1):239-246.
- [15] ATALLAH M, ELAIDY SM, TAWFIK MK. Assessment of the possible roles of SB-269970 versus ketanserin on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats: Oxidative stress/TGF-beta1-induced HSCs activation pathway[J]. Pharmacol Rep, 2018, 70(3):509-518.
- [16] SUSILO R, HAYAZA S, ANSORI A, et al. The effect of garcinia mangostana extract on ALT and AST levels and liver structure in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. Ann Bio, 2020, 36(2):149-153.
- [17] ZHANG BL, XU D, SHE LL, et al. Silybin inhibits NLRP3 inflammasome assembly through the NAD(+) /SIRT2 pathway in mice with nonalcoholic fatty liver disease[J]. Faseb J, 2018, 32(2):757-767.
- [18] 徐娇雅, 蒋雨薇, 杨丽丽, 等. 降脂颗粒调控UCP2和JNK/c-Jun介导的NLRP3炎症小体活化减轻非酒精性脂肪性肝炎小鼠脂毒性肝损伤[J]. 上海中医药大学学报, 2021, 35(2):43-49.
- [19] 刘颖慧, 牟新, 周迪夷, 等. 基于JNK信号通路探讨桑叶有效成分改善胰岛素抵抗的机制研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(5):1019-1025.
- [20] 翁惊凡, 郭航远, 池菊芳. JNK信号通路在糖尿病心肌病中的作用研究进展[J]. 浙江医学, 2020, 42(15):1664-1668.

(收稿日期:2022-03-10,修回日期:2022-05-06)