圣草酚调控MAPK和Nrf2/HO-1信号通路缓解非酒精性脂肪肝的作用及机制Δ

王楷扬[1*]，袁　烈[2,3]，宋　燚[2,3]，刘庆龙[4]，钟佩伶[2,3]，李文军[4]，蔡永青[1]，李小丽[2,3]，曾梦华[5]，陈剑鸿[1#]（1.陆军特色医学中心药剂科，重庆　400042；2.重庆医科大学药理学系，重庆　400016；3.药物代谢研究重庆市重点实验室，重庆　400016；4.重庆医科大学附属第三医院药剂科，重庆　401120；5.重庆医科大学附属第一医院胃肠外科，重庆　400016）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）23-2880-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.23.11

摘　要　目的　研究圣草酚缓解非酒精性脂肪肝（NAFLD）的作用及可能机制。**方法**　将16只C57BL/6J小鼠按体重随机分为对照组、NAFLD模型组和圣草酚低、高剂量组（50、100 mg/kg），每组4只。除对照组外，其余各组均使用高脂饲料诱导NAFLD模型。在预处理4周后，采取腹腔注射方式（0.01 mL/g）进行给药，每日1次，连续6周。测定小鼠体重、肝脏质量，观察小鼠肝组织病理损伤情况，测定小鼠血清中天冬氨酸转氨酶（AST）、丙氨酸转氨酶（ALT）和甘油三酯（TG）水平及肝组织中核转录因子红系2相关因子2（Nrf2）、血红素加氧酶1（HO-1）蛋白表达。使用0.5 mmol/L油酸诱导HepG2细胞建立体外NAFLD模型，实验设置正常对照组、NAFLD模型组和圣草酚低、中、高浓度组（50、100、150 μmol/L）；给药组在诱导模型的同时加入圣草酚，培养24 h。观察细胞中脂质沉积情况，检测细胞中TG、丙二醛（MDA）、活性氧（ROS）水平以及丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）信号通路相关蛋白[细胞外信号调节激酶（ERK）、c-Jun氨基末端激酶（JNK）]磷酸化水平和Nrf2、HO-1蛋白表达水平。**结果**　体内实验中，与NAFLD模型组比较，圣草酚低、高剂量组小鼠体重、肝脏质量和血清中AST、ALT和TG的水平（圣草酚低剂量组小鼠血清AST水平除外）均显著降低（$P<0.01$），脂滴沉积形成的空泡数量显著减少，Nrf2、HO-1蛋白表达水平进一步升高（$P<0.01$）。体外实验中，与NAFLD模型组比较，圣草酚低、中、高浓度组细胞中脂质沉积减少（$P<0.01$），ROS、MDA、TG水平显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），ERK、JNK磷酸化水平均显著下调（$P<0.01$），Nrf2、HO-1蛋白表达水平显著上调（$P<0.01$）。**结论**　圣草酚可能通过抑制MAPK信号通路，进而激活Nrf2/HO-1信号通路来缓解NAFLD。

关键词　圣草酚；非酒精性脂肪肝；丝裂原活化蛋白激酶；核转录因子红系2相关因子2；血红素加氧酶1

Effect and mechanism of eriodictyol on non-alcoholic fatty liver disease by regulating MAPK and Nrf2/HO-1 signaling pathway

WANG Kaiyang[1], YUAN Lie[2,3], SONG Yi[2,3], LIU Qinglong[4], ZHONG Peiling[2,3], LI Wenjun[4], CAI Yongqing[1], LI Xiaoli[2,3], ZENG Menghua[5], CHEN Jianhong[1]（1. Dept. of Pharmacy, Army Medical Center of PLA, Chongqing 400042, China; 2. Dept. of Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Chongqing Key Laboratory of Drug Metabolism Research, Chongqing 400016, China; 4. Dept. of Pharmacy, the Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401120, China; 5. Dept. of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the effect and potential mechanism of eriodictyol on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **METHODS** Sixteen C57BL/6J mice were randomly divided into control group, NAFLD model group, and eriodictyol low-dose and high-dose groups (50, 100 mg/kg), with 4 mice in each group. Except for control group, the other groups were fed with high fat diet to induce NAFLD model. After four weeks of preprocessing, they were given relevant medicine intraperitoneally (0.01 mL/g), once a day, for 6 consecutive weeks. The body weight and liver weight of mice were measured, and the pathological damage of liver tissue in mice was observed. The levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and triglycerides (TG) in serum, as well as the protein expressions of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) in liver tissue were determined. *In vitro* NAFLD model was established by using 0.5 mmol/L oleic acid (OA) in HepG2 cells. Normal control group, NAFLD model group and eriodictyol low-, medium- and high-concentration groups (50, 100, 150 μmol/L) were

Δ **基金项目**　重庆市临床药学重点专科建设项目；重庆市研究生教育“课程思政”示范项目（No.YKCSZ23057）；重庆市教委科学技术研究项目（No.KJQN201900409）

* **第一作者**　药师，硕士研究生。研究方向：天然药物在代谢性疾病中的药理作用。E-mail：408509991@qq.com

\# **通信作者**　主任药师，教授，博士生导师。研究方向：抗感染与化疗药物的分子机制及天然植物药作用机制。电话：023-68746956。E-mail：chenjh-110@263.net

set up. HepG2 cells in drug groups were treated with eriodictyol for 24 h at the time of modeling. The lipid deposition was observed in cells, and the levels of TG, malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) as well as the phosphorylation levels of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal pathway related proteins [extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun *N*-terminal kinase (JNK)] and the protein expressions of Nrf2 and HO-1 were all determined. **RESULTS** In the *in vivo* experiment, compared with the NAFLD model group, the body weight, liver weight, the serum levels of AST, ALT and TG were all decreased significantly in eriodictyol low- and high-dose groups (except for serum level of AST in eriodictyol low-dose group) ($P<0.01$); liver lipid deposition was reduced significantly and the protein expressions of Nrf2 and HO-1 in liver tissues were further up-regulated ($P<0.01$). In the *in vitro* experiment, compared with the NAFLD model group, the lipid deposition in hepatocytes was reduced in eriodictyol low-, medium- and high-concentration groups ($P<0.01$), and the levels of ROS, MDA and TG were down-regulated ($P<0.05$ or $P<0.01$); the phosphorylation levels of ERK and JNK were significantly down-regulated ($P<0.01$), while the protein expressions of Nrf2 and HO-1 were up-regulated significantly ($P<0.01$). **CONCLUSIONS** Eriodictyol can inhibit MAPK signaling pathway and activate Nrf2/HO-1 signaling pathway to alleviate NAFLD.

KEYWORDS eriodictyol; non-alcoholic fatty liver disease; mitogen-activated protein kinase; factor-erythroid 2-related factor 2; heme oxygenase-1

非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease,NAFLD)是一种较为常见的慢性肝脏疾病。当肝脏中脂质沉积超过肝脏质量的5%,同时排除过量饮酒或其他已知的肝脏疾病诱因时,即可判定为NAFLD[1]。目前统计的数据表明,世界范围内NAFLD的发病率约为25%[2]。而我国随着经济社会的发展,不同地区的NAFLD发病率自1990年以来也逐渐升高[3]。NAFLD最典型的特征是脂质的积累和沉积。脂质在肝脏中不断积累,会引起肝脏炎症;同时,随着脂质沉积的进一步增加,脂滴逐渐在肝脏中形成,导致肝纤维化甚至肝硬化的发生[4]。NAFLD已成为威胁人类健康的危险因素之一,而目前尚无有效的治疗方法,因此寻找有效的治疗药物迫在眉睫。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)相关信号通路是一类高度保守的信号通路,由3个亚群组成,包括细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase,ERK)、c-Jun氨基末端激酶(c-Jun *N*-terminal kinase,JNK)和p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK),在细胞增殖、应激、炎症和凋亡中发挥着核心作用[5]。当NAFLD发生后,由于肝脂质沉积诱发了肝脏炎症,MAPK信号通路可能会被激活[6]。MAPK通路的活化可以使核转录因子红系2相关因子2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2,Nrf2)磷酸化,促进Nrf2的核转位或增加Nrf2的表达,继而促进Nrf2的下游基因血红素加氧酶1(heme oxygenase-1,HO-1)的转录表达。抑制MAPK相关信号通路表达,可使机体氧化应激水平或炎症水平降低,从而延缓NAFLD的发生发展[6-7]。

圣草酚化学名为3′,4′,5,7-四羟二氢黄酮,是一种天然二氢黄酮类化合物,广泛存在于蔬菜、水果和中药中,特别是在柑橘类水果中的含量最为丰富。在北美,印第安人常使用富含圣草酚的植物作为药物治疗气喘、过敏性鼻炎、风湿等疾病[8]。随着对圣草酚研究的进一步深入,其被发现具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、保护神经系统等多种药理活性[8]。同时,也有研究表明圣草酚能够缓解胰岛素抵抗[9],对抗糖尿病引发的肝损伤[10]。本研究拟用C57BL/6J小鼠构建NAFLD体内模型,用HepG2细胞构建NAFLD体外模型,探究圣草酚缓解NAFLD的作用,并从MAPK和Nrf2/HO-1信号通路角度初步探究其可能的作用机制,为圣草酚的进一步开发利用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有:AE163型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司)、IX51型荧光倒置显微镜(日本Olympus公司)、TDL-5A型离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司)、Multiskan型全波长酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)、Mini-PROTEAN型垂直电泳设备电泳仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 主要药品与试剂

圣草酚对照品(批号20201011,纯度≥98%)为重庆医科大学附属第三医院药剂科刘松青教授课题组惠赠;丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase,ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase,AST)、甘油三酯(triglyceride,TG)和丙二醛(malondialdehyde,MDA)检测试剂盒(批号分别为20220506、20220504、20220506、20220508)均购自南京建成生物工程研究所;兔源过氧化物ERK、兔源磷酸化ERK(p-ERK)、兔源JNK、兔源磷酸化JNK(p-JNK)、兔源Nrf2、兔源HO-1、兔源β-肌动蛋白(β-actin)一抗均购自美国Cell Signaling公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;活性氧(reactive oxygen species,ROS)检测试剂盒(批号BB22041)购自上海贝博生物科技有限公司;BCA定量试剂盒(批号020123230510)购自上海碧云天生物科技有限公司;尼罗红染色试剂购自美国Sigma公司。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级健康C57BL/6J小鼠,共16只,雄性,6～8周龄,体重18～22 g,购自重庆医科大学实验动物中心,动物生产许可证号为SCXK(渝)2018-

0003。所有小鼠均饲养于重庆医科大学实验动物中心，饲养环境温度为（22±2）℃、相对湿度为55%、12 h光照/12 h黑暗循环。经过1周基础饲料适应性喂养后进行后续实验。本研究经陆军军医大学动物伦理委员会审核批准，伦理批件编号为AMUWEC20223914。

1.4 细胞系

人肝癌HepG2细胞系（货号CL-0103）购自武汉普诺赛生命科技有限公司，经STR鉴定正确。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 动物分组、造模与给药

将16只小鼠按照体重随机分为4组，分别为对照组、NAFLD模型组和圣草酚低、高剂量组（50、100 mg/kg）[11]，每组4只。对照组小鼠提供常规饲料进行喂养，其余3组小鼠提供高脂饲料喂养4周诱导NAFLD模型[12]；在预处理4周后，采取腹腔注射方式（0.01 mL/g）进行给药，每日1次，连续6周。对照组小鼠每日注射生理盐水，NAFLD模型组小鼠每日注射玉米油，圣草酚低、高剂量组小鼠每日分别注射相应剂量的圣草酚玉米油溶液。

2.1.2 动物一般情况观察

实验过程中，每日观察小鼠状况，每周记录小鼠体重变化，每2日称定并记录小鼠进食饲料的质量。

2.1.3 动物标本采集与处理

给药结束后，各组小鼠禁食不禁水24 h，经眼球取血，以3 000 r/min离心10 min，分离血清，－20 ℃冰箱中保存。取血后，脱颈处死小鼠，取出肝脏，用冷生理盐水冲洗，用滤纸吸干后对小鼠肝脏大体进行观察并拍照。称定肝脏质量，取部分肝组织用4%多聚甲醛固定，其余组织分装在EP管内，置于－80 ℃冰箱中保存。

2.1.4 血清中AST、ALT和TG水平测定

取冻存的血清，常规解冻后，按照相应试剂盒说明书操作，检测小鼠血清中AST、ALT和TG水平。

2.1.5 肝组织病理变化观察

取“2.1.3”项下经固定处理的肝组织，进行常规石蜡包埋切片（4 μm）后行常规苏木素-伊红（HE）染色，在荧光倒置显微镜下观察肝组织病变情况。

2.1.6 肝组织中Nrf2、HO-1蛋白表达检测

采用Western blot法进行检测。取“2.1.3”项下冻存的小鼠肝组织，使用高通量匀浆机将肝组织研磨后，加入Western及IP细胞裂解液提取总蛋白，采用BCA法测定总蛋白浓度。将蛋白高温变性后，取40 μg变性蛋白进行10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（电压80 V、电泳时间20 min；电压120 V、电泳时间40 min），湿法转膜（电流400 mA、转膜120 min），加入5%脱脂奶粉封闭2 h；使用TBST洗膜3次、5 min/次，加入Nrf2、HO-1和β-actin一抗（稀释比例均为1∶1 000），4 ℃孵育过夜；TBST洗膜，加入对应二抗（稀释比例1∶8 000），ECL化学发光显影。采用ChemiDoc XRS凝胶成像系统进行信号扫描，并使用Image J软件对扫描的蛋白条带灰度值进行定量分析。以目的蛋白与内参蛋白（β-actin）条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

2.2 体外实验

2.2.1 细胞培养及分组、造模、给药

使用含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的DMEM完全培养基，在37 ℃、5%CO_2的湿润培养箱中培养细胞，取对数生长期细胞用于实验。体外实验设置5个组，分别为正常对照组、NAFLD模型组和圣草酚低、中、高浓度组，每组设置3个复孔。正常对照组细胞正常培养，NAFLD模型组使用0.5 mmol/L油酸处理细胞，诱导体外NAFLD模型[13]。圣草酚低、中、高浓度组在使用0.5 mmol/L油酸处理细胞的同时，根据培养体系，分别加入浓度为0.05 mmol/L的圣草酚母液（使用二甲基亚砜溶解），使培养体系中圣草酚终浓度分别为50、100、150 μmol/L[11]。处理24 h后，收取细胞样本，冻存于－80 ℃冰箱中。

2.2.2 细胞中脂质沉积观察

采用尼罗红染色法进行观察。取HepG2细胞进行铺板（1×10^5个/孔），按“2.2.1”项下进行分组、处理细胞，然后用4%多聚甲醛固定30 min，按照尼罗红染色试剂操作说明进行染色，最后在荧光倒置显微镜下观察细胞中脂滴沉积情况，如有脂滴沉积可见细胞内有绿色高亮荧光。

2.2.3 细胞中TG、MDA和ROS水平测定

取“2.2.1”项下冻存的细胞样本，复温，以功率300 W超声（超声5 s间隔30 s，重复5次）破碎细胞，按照试剂盒说明书操作，测定细胞中TG、MDA和ROS水平。

2.2.4 细胞中MAPK和Nrf2/HO-1信号通路蛋白表达检测

取“2.2.1”项下冻存的细胞样本，复温后加入蛋白裂解液，冰上裂解30 min提取总蛋白，采用BCA法测定蛋白浓度。将蛋白高温变性后，取40 μg蛋白上样，参照“2.1.6”项下方法检测细胞中MAPK和Nrf2/HO-1信号通路相关蛋白的表达。其中，ERK、p-ERK、JNK、p-JNK、Nrf2、HO-1和β-actin（内参）一抗的稀释比例均为1∶1 000，二抗的稀释比例为1∶8 000。使用Image J软件分析蛋白条带灰度值，以目标蛋白与内参蛋白条带灰度值的比值表示目标蛋白的表达水平，以p-ERK与ERK、p-JNK与JNK蛋白表达的比值分别表示ERK、JNK蛋白的磷酸化水平。

2.3 统计学方法

采用Graphpad Prism 8.0软件进行统计分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间均数比较采用单因素方差分析，两组间均数比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 体内实验结果

3.1.1 小鼠体重和肝脏质量测定结果

与对照组比较，NAFLD模型组小鼠体重、肝脏质量均明显升高（$P<0.01$）。与NAFLD模型组比较，圣草酚低、高剂量组小鼠体重、肝脏质量均显著降低（$P<0.01$）。结果见表1。

表1 各组小鼠的体重和肝脏质量测定结果（$\bar{x}\pm s$，g）

组别	n	体重	肝脏质量
对照组	4	32.63±0.83	1.24±0.08
NAFLD模型组	4	44.55±1.34[a]	1.68±0.10[a]
圣草酚低剂量组	4	32.43±1.32[b]	1.11±0.06[b]
圣草酚高剂量组	4	30.20±1.55[b]	1.08±0.08[b]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与NAFLD模型组比较，$P<0.01$。

3.1.2 小鼠血清中AST、ALT和TG水平测定结果

与对照组比较，NAFLD模型组小鼠血清中AST、ALT和TG水平显著升高（$P<0.01$）；与NAFLD模型组比较，圣草酚低、高剂量组小鼠血清中ALT、TG水平和圣草酚高剂量组小鼠血清中AST水平均显著降低（$P<0.01$）。结果见表2。

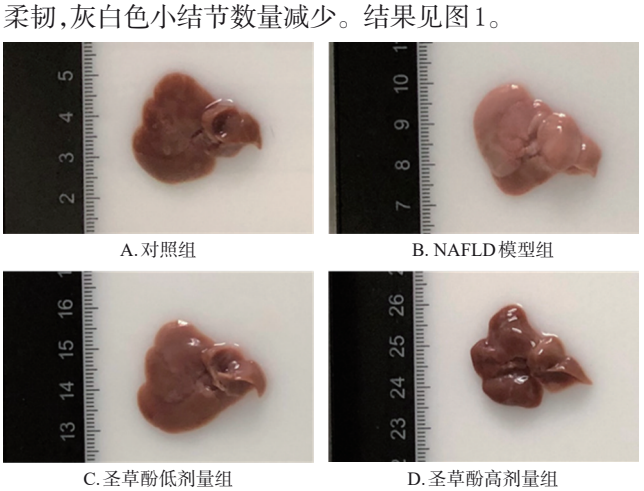
表2 各组小鼠血清中AST、ALT和TG水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

组别	AST/（U/L）	ALT/（U/L）	TG/（mmol/L）
对照组	98.50±11.69	27.75±3.10	0.84±0.10
NAFLD模型组	162.80±21.31[a]	84.00±11.34[a]	1.58±0.08[a]
圣草酚低剂量组	130.50±18.70	32.75±9.22[b]	1.18±0.06[b]
圣草酚高剂量组	113.50±9.75[b]	30.00±5.23[b]	1.30±0.08[b]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与NAFLD模型组比较，$P<0.01$。

3.1.3 小鼠肝脏大体观察结果

对照组小鼠肝脏表面光滑，呈深红色，质地柔韧；NAFLD模型组小鼠肝脏体积明显增大，表面呈浅红色，同时可见灰白色小结节；圣草酚低、高剂量组小鼠肝脏与NAFLD模型组比较，体积明显减小，表面红润，质地柔韧，灰白色小结节数量减少。结果见图1。



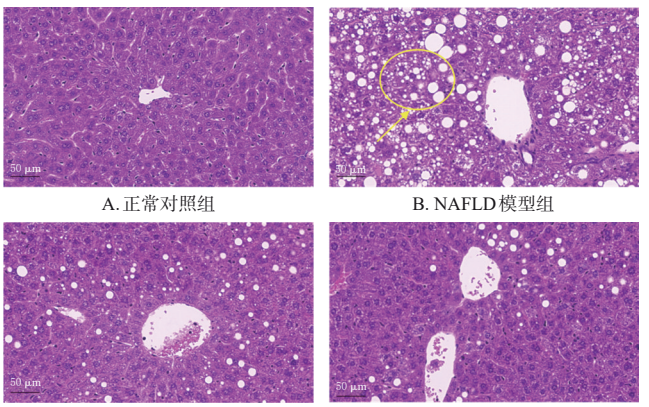
A. 对照组　B. NAFLD模型组

C. 圣草酚低剂量组　D. 圣草酚高剂量组

图1 各组小鼠肝脏大体形态观察结果

3.1.4 小鼠肝组织病理观察结果

对照组小鼠肝小叶结构清晰，肝组织结构正常，肝细胞索在中心静脉周围呈放射状排列，细胞质均匀，未出现脂肪空泡；NAFLD模型组小鼠肝组织发生病理性改变，出现大量脂滴沉积形成的空泡；与NAFLD模型组比较，圣草酚低、高剂量组小鼠肝组织病理变化得到显著改善，脂滴沉积形成的空泡数量显著减少。结果见图2。



A. 正常对照组　B. NAFLD模型组

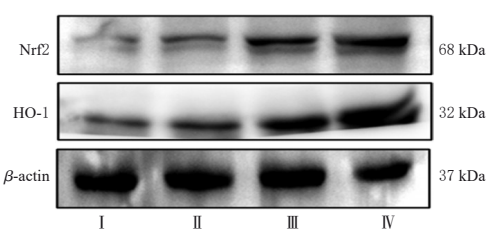
C. 圣草酚低剂量组　D. 圣草酚高剂量组

注：图中箭头所指为脂质沉积引起的脂肪空泡。

图2 各组小鼠肝组织病理形态观察结果（HE染色）

3.1.5 小鼠肝组织中Nrf2、HO-1蛋白表达测定结果

与对照组比较，NAFLD模型组小鼠肝组织中Nrf2、HO-1蛋白表达水平显著升高（$P<0.01$）；与NAFLD模型组比较，各给药组小鼠肝组织中Nrf2、HO-1蛋白表达水平均进一步升高（$P<0.01$）。结果见图3、表3。



Ⅰ：对照组；Ⅱ：NAFLD模型组；Ⅲ：圣草酚低剂量组；Ⅳ：圣草酚高剂量组。

图3 各组小鼠肝组织中Nrf2、HO-1蛋白表达的电泳图

表3 各组小鼠肝组织中Nrf2、HO-1蛋白表达水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

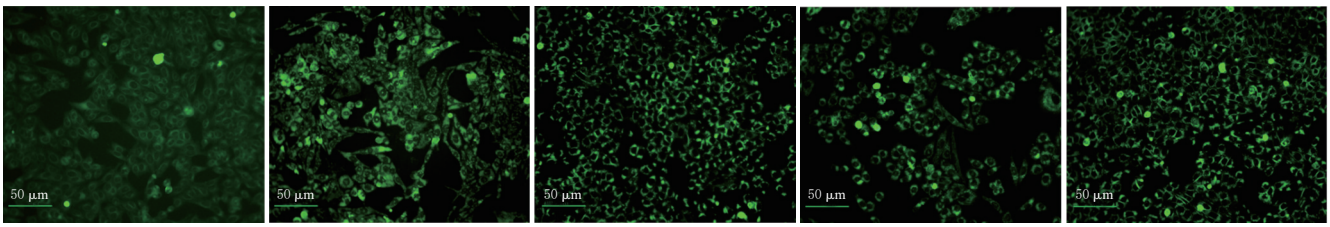
组别	Nrf2/β-actin	HO-1/β-actin
对照组	1.00±0.00	1.00±0.00
NAFLD模型组	1.49±0.04[a]	1.12±0.04[a]
圣草酚低剂量组	2.28±0.11[b]	1.76±0.02[b]
圣草酚高剂量组	4.62±0.19[b]	4.20±0.78[b]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与NAFLD模型组比较，$P<0.01$。

3.2 体外实验结果

3.2.1 细胞中脂质沉积观察结果

正常对照组细胞中未见尼罗红特异性染色的高亮脂滴（荧光强度11.10±0.21）；NAFLD模型组细胞中可见尼罗红特异性染色呈现的绿色荧光高亮区域，且荧光强度（76.73±0.93）显著高于正常对照组（$P<0.01$）；与NAFLD模型组比较，圣草酚低、中、高浓度组细胞中脂质沉积减少，荧光强度（分别为24.11±1.63、24.88±0.69、24.88±0.30）均显著降低（$P<0.01$）。结果见图4。



A. 正常对照组　B. NAFLD模型组　C. 圣草酚低浓度组　D. 圣草酚中浓度组　E. 圣草酚高浓度组

图4　各组细胞的尼罗红染色观察结果（×200）

3.2.2　细胞中MDA、ROS和TG水平测定结果

与正常对照组比较，NAFLD模型组细胞中MDA、ROS和TG水平显著升高（$P<0.01$）；与NAFLD模型组比较，各给药组细胞中MDA、ROS和TG水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表4。

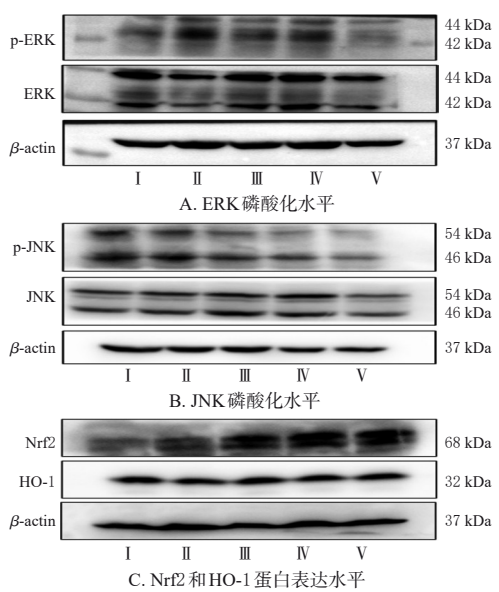
表4　各组细胞中MDA、ROS和TG水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，nmol/mg port）

组别	MDA	ROS	TG
正常对照组	0.87±0.09	89.90±11.64	0.14±0.01
NAFLD模型组	2.11±0.17[a]	236.50±55.30[a]	0.32±0.02[a]
圣草酚低浓度组	1.56±0.20[b]	133.50±32.24[c]	0.25±0.01[b]
圣草酚中浓度组	1.13±0.08[b]	124.30±22.74[b]	0.24±0.03[b]
圣草酚高浓度组	0.92±0.11[b]	110.60±24.45[b]	0.17±0.01[b]

a：与正常对照组比较，$P<0.01$；b：与NAFLD模型组比较，$P<0.01$；c：与NAFLD模型组比较，$P<0.05$。

3.2.3　细胞中MAPK和Nrf2/HO-1信号通路相关蛋白表达水平测定结果

与正常对照组比较，NAFLD模型组细胞中ERK、JNK磷酸化水平显著上调（$P<0.01$），Nrf2、HO-1蛋白表达水平显著下调（$P<0.01$）。与NAFLD模型组比较，圣草酚低、中、高浓度组细胞中ERK、JNK磷酸化水平均显著下调（$P<0.01$），Nrf2、HO-1蛋白表达水平均显著上调（$P<0.01$）。结果见图5、表5。



Ⅰ：正常对照组；Ⅱ：NAFLD模型组；Ⅲ：圣草酚低浓度组；Ⅳ：圣草酚中浓度组；Ⅴ：圣草酚高浓度组。

图5　各组细胞中MAPK和Nrf2/HO-1信号通路相关蛋白表达检测的电泳图

表5　各组细胞中MAPK和Nrf2/HO-1信号通路相关蛋白表达水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	p-ERK/ERK	p-JNK/JNK	Nrf2/β-actin	HO-1/β-actin
正常对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
NAFLD模型组	1.98±0.04[a]	1.11±0.03[a]	0.67±0.01[a]	0.81±0.05[a]
圣草酚低浓度组	1.27±0.06[b]	0.69±0.02[b]	1.00±0.02[b]	1.26±0.06[b]
圣草酚中浓度组	1.40±0.04[b]	0.49±0.05[b]	0.73±0.02[b]	1.23±0.05[b]
圣草酚高浓度组	1.15±0.03[b]	0.24±0.04[b]	0.75±0.01[b]	1.17±0.04[b]

a：与正常对照组比较，$P<0.01$；b：与NAFLD模型组比较，$P<0.01$。

4　讨论

NAFLD不仅是肝病致残和死亡的重要原因，而且与代谢综合征、2型糖尿病、动脉硬化性心脑血管疾病和肝癌的高发密切相关。因此，迫切需要发现其治疗靶点并开发有效的治疗药物来防治NAFLD。体内实验结果显示，圣草酚给药后能够缓解高脂饲料诱导的NAFLD模型小鼠肝脏中的脂质堆积，降低其体重、肝脏质量及血清中AST、ALT水平；体外实验结果也显示，使用圣草酚处理后同样能够减少HepG2细胞内脂质沉积，同时降低胞内ROS、MDA和TG水平。体内外实验结果表明，圣草酚能够缓解NAFLD。

研究表明，肝脏内脂质沉积变性会导致ROS过表达，进而激活MAPK信号通路，诱发氧化应激促进NAFLD的发展[14]。另有文献报道，抑制MAPK信号通路后会使Nrf2/HO-1信号通路激活，进而发挥抗炎、抗氧化等作用[15—16]。ERK和JNK信号转导通路是MAPK信号转导通路中的经典通路[17]，抑制ERK、JNK的蛋白表达和磷酸化能够缓解炎症和氧化应激[18]。Nrf2是细胞调节抗氧化应激反应的重要转录因子[19]。当出现氧化应激时，Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1（Kelch-like ECH-associated protein-1，Keap1）构象改变，从而使Nrf2从Keap1-Nrf2复合物中解离出来，由细胞质转位到胞核，启动下游的抗氧化应答元件，从而上调细胞的抗氧化因子HO-1等细胞保护蛋白的活性，以避免氧化应激对肝的损伤[19—20]。在体内外研究中，笔者通过相关实验验证了圣草酚给药后能够有效抑制细胞中ERK、JNK的活性，上调模型动物/细胞中Nrf2、HO-1的表达。该结果表明，圣草酚能够抑制MAPK信号通路，进而激活Nrf2/HO-1信号通路发挥抗氧化应激的作用，从而缓解NAFLD。

综上所述，笔者通过体内外NAFLD模型初步验证了圣草酚缓解NAFLD的效果，且其作用可能与抑制MAPK信号通路，进而激活Nrf2/HO-1信号通路发挥抗氧化应激有关。但本研究尚未通过加入抑制剂等方式

进行反向验证，机制方面尚需进一步确证。同时，本研究还存在着动物样本量较少的局限性，需要在后续研究中进一步扩大样本量，从而进一步确证圣草酚缓解NAFLD的作用及机制。

参考文献

[1] HONG T，CHEN Y Y，LI X Y，et al. The role and mechanism of oxidative stress and nuclear receptors in the development of NAFLD[J]. Oxid Med Cell Longev，2021，2021：6889533.

[2] MARTÍN-FERNÁNDEZ M，ARROYO V，CARNICERO C，et al. Role of oxidative stress and lipid peroxidation in the pathophysiology of NAFLD[J]. Antioxidants，2022，11(11)：2217.

[3] YOUNOSSI Z，TACKE F，ARRESE M，et al. Global perspectives on nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis[J]. Hepatology，2019，69(6)：2672-2682.

[4] FRANCQUE S，SZABO G，ABDELMALEK M F，et al. Nonalcoholic steatohepatitis：the role of peroxisome proliferator-activated receptors[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol，2021，18(1)：24-39.

[5] 周慧敏，张洁，黄蕾，等. 人参皂苷Rg_1通过抑制NOX4/MAPK通路减轻棕榈酸钠诱导HMCs细胞的纤维化[J]. 中国药理学通报，2023，39(5)：917-925.
ZHOU H M，ZHANG J，HUANG L，et al. Ginsenoside Rg_1 attenuates palmitate-induced HMCs fibrosis by inhibiting NOX4/MAPK pathways[J]. Chin Pharmacol Bull，2023，39(5)：917-925.

[6] DING J X，WU L L，ZHU G X，et al. HADHA alleviates hepatic steatosis and oxidative stress in NAFLD via inactivation of the MKK3/MAPK pathway[J]. Mol Biol Rep，2023，50(2)：961-970.

[7] VARGAS-POZADA E E，RAMOS-TOVAR E，ACERO-HERNÁNDEZ C，et al. Caffeine mitigates experimental nonalcoholic steatohepatitis and the progression of thioacetamide-induced liver fibrosis by blocking the MAPK and TGF-β/Smad3 signaling pathways[J]. Ann Hepatol，2022，27(2)：100671.

[8] 吕凤，杜倩，奚鑫，等. 圣草酚药理作用研究进展[J]. 中草药，2019，50(23)：5907-5912.
LYU F，DU Q，XI X，et al. Advances in studies on pharmacological effects of eriodictyol[J]. Chin Tradit Herb Drugs，2019，50(23)：5907-5912.

[9] ISLAM A，ISLAM M S，RAHMAN M K，et al. The pharmacological and biological roles of eriodictyol[J]. Arch Pharm Res，2020，43(6)：582-592.

[10] 杨敏，张锋，付姣，等. 圣草酚对高脂饮食诱导的糖尿病大鼠肝损伤的保护作用及机制探讨[J]. 天津中医药大学学报，2022，41(3)：355-360.
YANG M，ZHANG F，FU J，et al. The protective effect and mechanism of eriodictyol on the liver injury in diabetic rats induced by high-fat diet[J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med，2022，41(3)：355-360.

[11] 刘庆龙，郑相如，李文军，等. 圣草酚调控Akt/mTOR通路对胶质瘤细胞自噬的影响[J]. 天然产物研究与开发，2023，35(1)：13-21.
LIU Q L，ZHENG X R，LI W J，et al. Effect of eriodictyol on autophagy in glioma cells via Akt/mTOR signaling pathway[J]. Nat Prod Res Dev，2023，35(1)：13-21.

[12] GAO Y，ZHANG W，ZENG L Q，et al. Exercise and dietary intervention ameliorate high-fat diet-induced NAFLD and liver aging by inducing lipophagy[J]. Redox Biol，2020，36：101635.

[13] LI J D，WANG T Q，LIU P 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.

[14] WU D D，LIU Z G，WANG Y Z，et al. Epigallocatechin-3-gallate alleviates high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease via inhibition of apoptosis and promotion of autophagy through the ROS/MAPK signaling pathway[J]. Oxid Med Cell Longev，2021，2021：5599997.

[15] LEE D H，PARK J S，LEE Y S，et al. SQSTM1/p62 activates NFE2L2/NRF2 via ULK1-mediated autophagic KEAP1 degradation and protects mouse liver from lipotoxicity[J]. Autophagy，2020，16(11)：1949-1973.

[16] VANANI A R，KALANTARI H，MAHDAVINIA M，et al. Dimethyl fumarate reduces oxidative stress，inflammation and fat deposition by modulation of Nrf2，SREBP-1c and NF-κB signaling in HFD fed mice[J]. Life Sci，2021，283：119852.

[17] 廖媛，池晓玲，杨以琳，等. 脂必泰对非酒精性脂肪肝病大鼠肝组织ERK和TLR4表达的影响[J]. 中药药理与临床，2019，35(6)：130-134.
LIAO Y，CHI X L，YANG Y L，et al. Effects of Zhibitai on the expressions of ERK and TLR4 in liver tissues of NAFLD rats[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med，2019，35(6)：130-134.

[18] 徐冬梅，陈勇，方朝晖，等. 基于MAPK途径探讨丹蛭降糖胶囊改善高脂血症大鼠肝损伤的机制[J]. 中国中药杂志，2019，44(14)：2953-2959.
XU D M，CHEN Y，FANG Z H，et al. Mechanism of Danzhi Jiangtang capsules on improving liver injury in hyperlipidemia rats based on MAPK pathway[J]. China J Chin Mater Med，2019，44(14)：2953-2959.

[19] PILLAI R，HAYASHI M，ZAVITSANOU A M，et al. NRF2：KEAPing tumors protected[J]. Cancer Discov，2022，12(3)：625-643.

[20] BAE S H，SUNG S H，OH S Y，et al. Sestrins activate Nrf2 by promoting p62-dependent autophagic degradation of Keap1 and prevent oxidative liver damage[J]. Cell Metab，2013，17(1)：73-84.

（收稿日期：2023-04-14　修回日期：2023-09-23）
（编辑：林　静）