

本文引文格式:孙武,周兵,毛国梁,等.蛇床子素改善小鼠实验性肝损伤机制的研究[J].  
右江民族医学院学报,2022,44(5):633-637.

【论著与临床报道】

## 蛇床子素改善小鼠实验性肝损伤机制的研究

孙武,周兵,毛国梁,彭静,刘银华

(皖南医学院第一附属医院,弋矶山医院病理科,安徽 芜湖 241000)

**摘要:**目的 探讨蛇床子素对四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )诱导的实验性小鼠肝损伤的作用及其相关机制。方法 18只C57BL/6小鼠随机分成3组:①空白对照组:小鼠每天给予80  $\mu\text{L}$ 玉米油腹腔注射;② $\text{CCl}_4$ 造模组:给小鼠腹腔注射 $\text{CCl}_4$ (0.07 g/kg),1周3次,共持续3周,诱发肝组织损伤;③蛇床子素组:在小鼠腹腔注射 $\text{CCl}_4$ (0.07 g/kg)3周后,提前24 h给予小鼠腹腔注射蛇床子素(0.1 g/kg),共1次。摘取小鼠眼球提取血浆,测定转氨酶指标谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)的表达水平,了解肝脏损伤情况;提取小鼠肝组织,检测丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)氧化应激指标的变化情况;采用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time PCR)检查小鼠肝组织炎症指标:白介素-1 $\beta$ (interleukin, IL-1 $\beta$ ), IL-6以及肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor-alpha, TNF- $\alpha$ ) mRNA的表达情况;利用蛋白质免疫印迹(Western blot)技术观测肝组织AMPK蛋白磷酸化水平情况。**结果**  $\text{CCl}_4$ 作用后小鼠转氨酶指标AST和ALT明显升高( $P < 0.01$ ),氧化应激MDA水平显著上调( $P < 0.01$ ),GSH生成受到抑制( $P < 0.01$ ),炎症因子IL-1 $\beta$ , IL-6和TNF- $\alpha$  mRNA的表达水平升高( $P < 0.01$ ),蛇床子素处理后这些指标明显逆转( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),表明肝功能明显改善。 $\text{CCl}_4$ 作用后肝组织AMPK磷酸化显著增强,蛇床子素可以抑制该蛋白的磷酸化( $P < 0.05$ )。**结论** 蛇床子素可以改善 $\text{CCl}_4$ 引起的肝损伤;具体原因可能与减轻氧化应激,下调炎症因子表达有关,相关信号通路可能与其抑制AMPK的磷酸化有关。

**关键词:**蛇床子素;四氯化碳;炎症;氧化应激

中图分类号:R575

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2022)05-0633-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2022.05.004

## Study on mechanism of osthole in improving experimental liver injury in mice

Sun Wu, Zhou Bing, Mao Guoliang, Peng Jing, Liu Yinhu

(Department of Pathology, Yijishan Hospital, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241000, Anhui, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of osthole on liver injury induced by carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ ) in mice and its related mechanism. **Methods** Eighteen C57BL/6 mice were randomly divided into 3 groups: ①Blank control group: mice were intraperitoneally injected with 80  $\mu\text{L}$  corn oil every day; ② $\text{CCl}_4$  model group: mice were intraperitoneally injected with  $\text{CCl}_4$  (0.07 g/kg) three times a week for 3 weeks to induce liver tissue injury; ③Osthole group: After three-week intraperitoneal injection with  $\text{CCl}_4$  (0.07 g/kg), mice were intraperitoneally injected with osthole (0.1 g/kg) 24 h in advance, once in total. And then the eye-balls of the mice were extracted for plasma extraction, and the expression levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured to understand the liver injury. Mice liver tissues were extracted to detect the changes of oxidative stress indexes, malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH). Real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (real-time PCR) was used to detect the inflammatory indexes of mice liver tissues: the mRNA expression of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 and tumor

基金项目:安徽高校自然科学基金项目(KJ2018A0250);皖南医学院科研基金重点项目(WK2021ZF07)

第一作者简介:孙武(1991-),男,硕士,技师,研究方向:肝损伤与肝脏恶性肿瘤,E-mail:527068565@qq.com

通讯作者简介:刘银华(1976-),男,硕士,主任医师,研究方向:消化道肿瘤与免疫,E-mail:liuyinhua@yjsyy.com

necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). The phosphorylation of AMPK protein in liver tissues was detected by Western blot. **Results** After CCl<sub>4</sub> treatment, AST and ALT significantly increased ( $P < 0.01$ ); MDA level in oxidative stress significantly increased ( $P < 0.01$ ); GSH production was inhibited ( $P < 0.01$ ), and the mRNA expression levels of inflammatory factors IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  increased ( $P < 0.01$ ). These indexes were significantly reversed after osthole treatment ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), indicating that liver function was significantly improved. The phosphorylation of AMPK in liver tissue was significantly enhanced after CCl<sub>4</sub> treatment, and osthole could inhibit the phosphorylation of AMPK protein ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Osthole can reduce CCl<sub>4</sub> induced liver injury. The specific reasons may be related to reducing oxidative stress, down-regulating the expression of inflammatory factors, and associated signaling pathways may be related to its inhibition of AMPK phosphorylation.

**Key words:** osthole; CCl<sub>4</sub>; inflammation; oxidative stress

肝脏是机体内源性和外源性物质生物转化的桥梁,在人体的物质代谢、解毒和物质转运等方面起着重要的调节作用<sup>[1]</sup>。肝细胞产生的抗氧化酶系统可以对抗外来的活性氧和氮自由基等,正常情况下两者处于动态平衡<sup>[2]</sup>。但当氧化应激损伤超过自身清除能力,自由基超负荷后,肝脏是最易受到损害的器官之一<sup>[3]</sup>。自由基作用于细菌的细胞壁以及蛋白质、脂质和 DNA 等大分子,氧化后诱发肝炎、肝纤维化、肝硬化甚至肝癌<sup>[4]</sup>。同时,氧化应激改变了细胞实质和细胞外基质比例,促进免疫反应产生,其所释放的炎症介质通过反馈环路进一步加重肝损伤<sup>[5]</sup>。中国大约有 3 亿人遭受肝病的困扰。然而目前治疗肝损伤的药物主要是消除炎症刺激,没有大的突破,因而迫切需要探寻更有效的治疗手段。近年来很多植物提取物进入研究者视线,在实验中也表现出良好的肝保护作用。香豆素化合物提取物蛇床子素,主要存在于伞形科植物科果实中。其中植物蛇床的果实含量最高,由此命名<sup>[6]</sup>。在其他植物中,如芸香科和豆科植物,蛇床子素含量也比较高,提取容易,成本不高。蛇床子素的核心结构主要包括香豆素和异戊烯结构,其中异戊烯结构在抵抗细菌、病毒等方面具有十分重要的意义。随着研究的不断深入,蛇床子素抗氧化作用和抗炎功效也被挖掘出来<sup>[7]</sup>。蛇床子素也可以逆转肝细胞脂肪变性,减少甘油三酯从头合成,减轻肝细胞炎症的作用<sup>[8]</sup>。本研究中,采用腹腔注射四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)诱导肝细胞损伤,制造小鼠实验性肝损伤模型,观察蛇床子素作用效果,对其作用机制进行了基本的探究。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 皖南医学院附属弋矶山医院中心实验室提供的 SPF 级别的 C57BL/6 小鼠,体重 19~21 g,实验动物许可证为:SYXK(皖)2018-004。

1.2 实验耗材 抗体 AMPK 购于美国 CST 公司,货号:SC-101630;蛇床子素,货号:CS-B0915,购于碧云天生物公司;PKA 抑制剂 H89,货号:130964-39-5

购自 MCE 公司;试剂盒谷丙转氨酶(ALT),货号:abs580002;谷草转氨酶(AST),货号:abs580004,购自爱必信公司;丙二醛(MDA)试剂盒,货号:A003-1 购于南京建成生物公司;CCl<sub>4</sub>,货号:56-2-5,购于南京试剂商城。

### 1.3 实验方法

1.3.1 小鼠肝纤维化造模 ①空白对照组:小鼠每天给予 80  $\mu$ L 玉米油腹腔注射;②CCl<sub>4</sub>造模组:给小鼠腹腔注射 CCl<sub>4</sub>(0.07 g/kg),1 周 3 次,共持续 3 周,诱发肝组织损伤;③蛇床子素组:在小鼠腹腔注射 CCl<sub>4</sub>(0.07 g/kg)3 周后,提前 24 h 给予小鼠腹腔注射蛇床子素(0.1 g/kg),共 1 次。PKA 抑制剂 H89 组小鼠:在给予蛇床子素前 30 min,小鼠腹腔注射 PKA 抑制剂 H89(0.01 g/kg)。蛇床子素给药剂量在预实验中进行了摸索,0.1 g/kg 为最有效剂量。

1.3.2 小鼠血清 ALT/AST 活性检测及肝脏组织 GSH、MDA 水平检测 小鼠血清 ALT/AST 活性检测以及小鼠肝脏组织 GSH、MDA 水平均按照试剂盒说明书进行检测。

1.3.3 炎症因子 real-time PCR 检测 采用 Taqman 逆转录试剂盒,将 RNA 逆转录成 cDNA。Real-time PCR 应用 SYBR Premix Extaq™(台湾生工公司),反应体系为:SYBR Premix Extaq™ 5  $\mu$ L,模板 2.5  $\mu$ L,引物 0.5  $\mu$ L,蒸馏水 2.0  $\mu$ L。反应体系:95  $^{\circ}$ C 先预变性 6 min,之后 80  $^{\circ}$ C 变性 1 min,总计循环 40 次。采用 Applied Biosystems 7500 real-time PCR System 进行扩增,解析扩增曲线和分离曲线。数据以 GAPDH 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法分析计算。引物序列,见表 1。

1.3.4 Western blot 检测小鼠肝组织 AMPK 蛋白磷酸化表达情况 将空白对照组、CCl<sub>4</sub>造模组以及蛇床子素组三组小鼠组织匀浆,提取各组小鼠总蛋白,BCA 法检测各组总蛋白浓度,根据标准曲线计算上样量,100  $^{\circ}$ C 加热变性,取 30  $\mu$ g 蛋白样品行 SDS-PAGE

表 1 引物名称和序列

名称(人源)	序列(5'-3')
IL-1 $\beta$	F:GAATGACGCCCTCAATCAAAGT R:TCATCTTGGGCAGTCACATACA
IL-6	F:CCTGAACCTTCCAAAGATGGC R:TTCACCAGGCAAGTCTCCTCA
TNF- $\alpha$	F:GAGGCCAAGCCCTGGTATG R:CGGGCCGATTGATCTCAGC
GAPDH	F:TGTTTCGTCATGGGTGTGAACC R:GCAGTGATGGCATGGACTGTG

(聚丙烯酰胺凝胶电泳)反应,采用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上(转膜时间 90 min)后用 2.5% 的 BSA 于室温封闭 15 min;洗膜 3 次,每次 10 min;然后加入相应的一抗,4 °C 摇床孵育过夜;TBST 液洗去膜上未结合的一抗,每次 10 min,共洗 3 次;加入 HRP 标记的二抗,室温孵育 1 h;TBST 液洗去未结合的二抗,每次 10 min,共 3 次;加入 ECL 发光液进行曝光摄影。拷贝数据使用 Image J 分析色带的灰度值。实验共重复 3 次。

1.3.5 小鼠肝组织苏木素-伊红(hematoxylin eosin, HE)染色 收集小鼠病变处肝脏组织标本放于中性甲醛溶液固定 22~24 h 后,酒精梯度脱水、透明、浸蜡;莱卡自动染色机染色,中性树胶封固,显微镜下观察。

1.3.6 天狼星红染色 石蜡切片脱蜡至蒸馏水,天狼星红染色液 1 h,流水冲洗 10 s,0.5% 醋酸 20 s,无水乙醇 1 min 3 遍,二甲苯 1 min 3 遍中性树胶封片。

1.4 统计学方法 所有的实验数据均通过软件 SPSS 18.0 进行分析。计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较使用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 蛇床子素对 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠肝损伤的作用效果

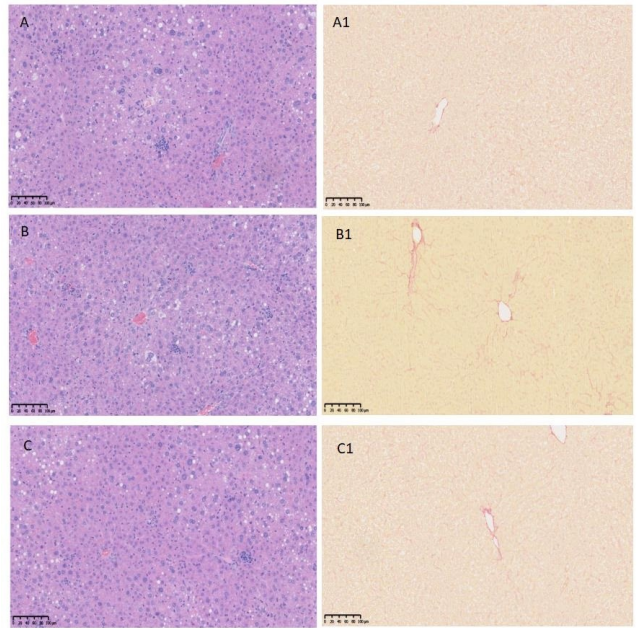
首先检测小鼠血浆 ALT、AST 水平,CCl<sub>4</sub> 作用引起的急性肝损伤后肝脏转氨酶指标明显升高,显著高于对照组( $P < 0.01$ ),蛇床子素组小鼠 ALT、AST 的活力低于 CCl<sub>4</sub> 组小鼠( $P < 0.05$  或者  $P < 0.01$ )。实验结果见表 2。肝组织 HE 染色显示:正常对照组小鼠肝细胞结构完整,纤维结构正常,没有明显肝脂质沉积;CCl<sub>4</sub> 组小鼠的肝细胞脂质蓄积明显增加,肝细胞之间纤维间隔增宽,中性粒细胞、淋巴细胞等炎细胞浸润比例明显增加;蛇床子素组小鼠 HE 染色显示小鼠肝脏脂质蓄积明显减少,中性粒细胞、淋巴细胞等炎细胞的浸润比例相对于 CCl<sub>4</sub> 造模组小鼠降低。天狼星红染色观察肝纤维化水平,正常对照组小鼠肝细胞结构完整,未发生明显纤维化改变;CCl<sub>4</sub> 造模组小鼠肝脏纤维化面积明显增加;蛇床子素组小鼠肝脏纤维

化指标较 CCl<sub>4</sub> 造模组小鼠明显减少,见图 1。

表 2 蛇床子素对 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠急性肝损伤

组别	<i>n</i>	ALT、AST 水平的影响	
		ALT	AST
正常对照组	6	30.96 ± 3.54	24.36 ± 6.29
CCl <sub>4</sub> 造模组	6	116.76 ± 6.79 <sup>a</sup>	103.61 ± 15.03 <sup>a</sup>
蛇床子素组	6	96.44 ± 5.97 <sup>c</sup>	86.37 ± 5.03 <sup>b</sup>

注:①表内计量资料数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示;②与正常对照组比较,a:  $P < 0.01$ ;与 CCl<sub>4</sub> 造模组比较,b:  $P < 0.05$ ,c:  $P < 0.01$ 。



A. 正常对照组 HE 染色;A1. 正常对照组天狼星红染色;B. CCl<sub>4</sub> 造模组 HE 染色;B1. CCl<sub>4</sub> 造模组天狼星红染色;C. 蛇床子素组 HE 染色;C1. 蛇床子素组天狼星红染色。

图 1 各组小鼠肝组织 HE 染色和天狼星红染色镜下表现

2.2 蛇床子素对 CCl<sub>4</sub> 肝损伤小鼠谷胱甘肽(GSH)、MDA 活力的影响 CCl<sub>4</sub> 作用小鼠后 GSH 生成显著受到抑制,氧化应激水平 MDA 的表达显著上调。CCl<sub>4</sub> 造模组小鼠 MDA 活性明显高于正常对照组小鼠( $P < 0.01$ ),GSH 与之比较也明显减少( $P < 0.01$ );蛇床子素组小鼠 GSH 生成明显高于 CCl<sub>4</sub> 造模组小鼠( $P < 0.05$ ),MDA 活力显著降低( $P < 0.05$ )。见表 3。小鼠在 CCl<sub>4</sub> 诱导急性肝损伤后,其炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 表达明显升高,显著高于正常对照组( $P < 0.01$ )。蛇床子素组小鼠炎症因子 mRNA 表达明显低于 CCl<sub>4</sub> 造模组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见表 4。

2.3 PKA 抑制剂 H89 对蛇床子素炎症因子表达的

影响  $\text{CCl}_4$  造模组小鼠炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 水平明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 蛇床子素组小鼠炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 相较于造模组小鼠明显减少 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。H89 组小鼠炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 水平相较于蛇床子素组小鼠, 并没有明显的改变, 差异无统计学意义。见表 5。

表 4 蛇床子素对  $\text{CCl}_4$  急性肝损伤炎症指标的影响

组别	n	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$
正常对照组	6	1.55 $\pm$ 0.63	3.55 $\pm$ 2.86	1.58 $\pm$ 0.92
$\text{CCl}_4$ 造模组	6	73.13 $\pm$ 12.58 <sup>a</sup>	62.01 $\pm$ 11.74 <sup>a</sup>	6.93 $\pm$ 1.89 <sup>a</sup>
蛇床子素组	6	24.63 $\pm$ 9.87 <sup>c</sup>	44.81 $\pm$ 5.92 <sup>b</sup>	4.55 $\pm$ 0.92 <sup>b</sup>

注:①表内计量资料数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示;②与正常对照组比较, a:  $P < 0.01$ ; 与  $\text{CCl}_4$  造模组比较, b:  $P < 0.05$ , c:  $P < 0.01$ 。

表 5 PKA 抑制剂 H89 对  $\text{CCl}_4$  急性肝损伤炎症指标的影响

组别	n	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$
正常对照组	6	3.47 $\pm$ 1.23	4.22 $\pm$ 1.86	2.08 $\pm$ 1.34
$\text{CCl}_4$ 造模组	6	67.13 $\pm$ 10.58 <sup>a</sup>	57.33 $\pm$ 7.74 <sup>a</sup>	10.24 $\pm$ 2.69 <sup>a</sup>
蛇床子素组	6	27.55 $\pm$ 8.96 <sup>c</sup>	38.64 $\pm$ 6.78 <sup>b</sup>	5.49 $\pm$ 1.27 <sup>b</sup>
H89 组	6	26.44 $\pm$ 6.77 <sup>c</sup>	40.02 $\pm$ 5.79 <sup>b</sup>	6.78 $\pm$ 2.99 <sup>b</sup>

注:①表内计量资料数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示;②与正常对照组比较, a:  $P < 0.01$ ; 与  $\text{CCl}_4$  造模组比较, b:  $P < 0.05$ , c:  $P < 0.01$ 。

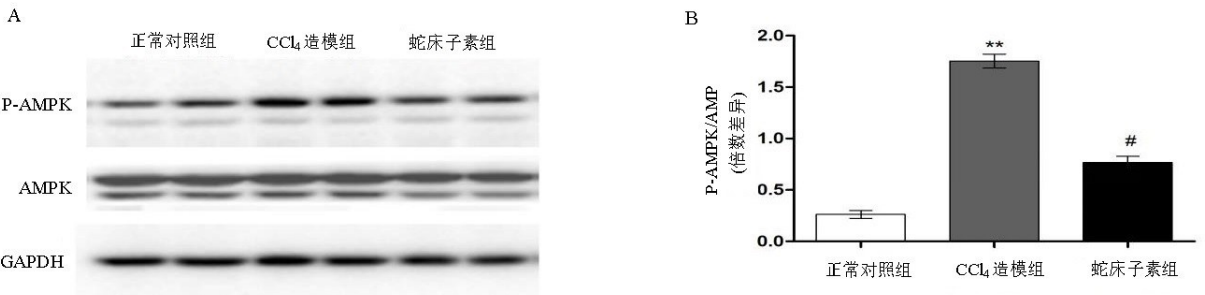
2.4 蛇床子素对 AMPK 蛋白磷酸化水平的影响 与正常对照组小鼠比较,  $\text{CCl}_4$  引起的肝组织损伤可以显著上调肝脏 AMPK 蛋白的磷酸化水平 ( $P < 0.01$ );

表 3 蛇床子素对  $\text{CCl}_4$  急性肝损伤 GSH、MDA 生成的影响 单位: mmol/L

组别	n	GSH	MDA
正常对照组	6	1.56 $\pm$ 0.11	6.30 $\pm$ 1.49
$\text{CCl}_4$ 造模组	6	0.81 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	12.16 $\pm$ 1.74 <sup>a</sup>
蛇床子素组	6	1.13 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	9.63 $\pm$ 0.74 <sup>b</sup>

注:①表内计量资料数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示;②与正常对照组比较, a:  $P < 0.01$ ; 与  $\text{CCl}_4$  造模组比较, b:  $P < 0.05$ 。

蛇床子素组小鼠 AMPK 蛋白的磷酸化水平相较于  $\text{CCl}_4$  造模组小鼠有所降低 ( $P < 0.05$ )。见图 2。



注: A. Western blot 检测各组小鼠 AMPK 蛋白水平的磷酸化情况; B. 各组小鼠蛋白表达水平的灰度值比较。

与正常对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与  $\text{CCl}_4$  造模组比较, #  $P < 0.05$ 。

图 2 各组小鼠 AMPK 蛋白磷酸化水平表达水平

### 3 讨论

临床上, 蛇床子素一直作为治疗皮肤病的药物。先前的研究表明, 蛇床子素可以对抗对乙酰氨基酚引起的肝损伤<sup>[9-10]</sup>, 也可以调节酒精性脂肪肝<sup>[11]</sup>。本研究中, 蛇床子素能够明显改善  $\text{CCl}_4$  引起的肝组织损伤, 降低肝脏转氨酶 ALT、AST 的水平, 表现出良好的肝脏保护作用, 这与先前的研究结果相一致<sup>[12]</sup>。

氧化应激在肝损伤中扮演着十分重要的作用, 肝

脏源源不断的诱导内源性抗氧化酶系统产生各种抗氧化物质如超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽-s-转移酶(GST)、过氧化氢酶(catalase)和 GSH 等来对抗体内外自由基引起的损伤。自由基会损害肝实质细胞, 导致慢性炎症反应。本研究发现  $\text{CCl}_4$  诱导的小鼠肝脏高炎症活性可以被蛇床子素逆转, 基于此本研究检测了脂质过氧化产物 MDA, 发现蛇床子素可以显著抑制该产物的产生。这与很多药物使用  $\text{CCl}_4$  造模的结果

相同<sup>[13]</sup>。同时升高了体内 GSH 水平,维持了机体内相对的稳态环境,促进了机体的抗氧化作用。由此表明,蛇床子素的调节作用是抑制体内脂质过氧化,促进了还原性产物生成,以维持正常的稳态条件。

蛇床子素通过抑制磷酸二酯酶 4(PDE4),上调 cAMP 水平,从而发挥强大的抗炎作用。在本研究中发现了蛇床子素可以抑制炎症因子(IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ )的表达水平,但是使用 PKA 抑制剂 H89 后,并不能逆转蛇床子素的肝脏保护效应,表明蛇床子素对 CCl<sub>4</sub> 肝损伤机制的调节并不是通过 cAMP/PKA 信号通路。其实蛇床子素的生物学活性多样,可以抑制巨噬细胞的活化,抑制库弗斯细胞的激活<sup>[14]</sup>。因此,蛇床子素升高 cAMP 水平可能不是其主要的抗炎机制,具体的作用通路可能更加复杂多样。

先前已有文献报告 AMPK 磷酸化水平增加能够促进肝脂质蓄积,导致肝脂肪变性<sup>[11]</sup>。但是具体的作用机制仍不清楚,可能与增加脂肪酸的合成,减少脂肪酸的运输和抑制脂肪酸的氧化相关。但是在不同的模型、不同的细胞器其功能是不一样的,显示出其差异化的调节功能。因为 AMPK 有 3 个亚基,不同的亚基被磷酸化后,不同活性位点激活后功能也并不相同。有文献表明在 AMPK 蛋白的上游肝激酶 B1(LKB1)激活后,能够通过 Ca<sup>2+</sup> 通道激活钙调素依赖性激酶(CaMKK)进行磷酸化 AMPK 的苏氨酸 172 位点,进而调控线粒体的生物合成和增强脂肪酸的氧化<sup>[15]</sup>。但是在胰岛素刺激后,AMPK 的丝氨酸位点 485/491 位点会被磷酸化,从而增加脂肪酸的合成,促进细胞内脂质蓄积<sup>[16]</sup>。因而,对于这一多位点的蛋白调节,各种信号通路会相互交错,具体机制需要具体分析。

综上所述,本研究主要通过 CCl<sub>4</sub> 造模诱导肝损伤模型,发现蛇床子素能够部分减缓其损伤效应,其效应并不依赖 cAMP/PKA 通路,可能是通过调节 AMPK 磷酸化水平进而发挥作用。但该研究还有很多不足,仍需进一步对 AMPK 磷酸化下游的效应分子进行研究,如采用 AMPK 抑制剂观察其对体内、体外实验中氧化应激和炎症因子水平的影响,检查蛇床子素作用后具体磷酸化位点,构建更加明确的信号通路,因而后续需要增加更多的实验方法进行研究。本研究发现蛇床子素可以缓解 CCl<sub>4</sub> 作用引起的肝损伤,希望该研究能为临床肝损伤治疗提供新的指导方向,进一步丰富蛇床子素的药用价值。

#### 参考文献:

[1] 李沙,苏文,张晓燕,等.花生四烯酸代谢与肝脏糖脂代谢稳态调控[J].生理学报,2021,73(4):657-664.  
[2] RITESH K R,SUGANYA A,DILEEPKUMAR H V,et al. A single acute hepatotoxic dose of CCl<sub>4</sub> causes oxida-

tive stress in the rat brain[J]. Toxicol Rep,2015,2: 891-895.

- [3] VOLOSHCHUK O N,STUS Y V,KOPYLCHUK G P. Features of free radical processes in the liver of rats with a nutrient imbalance[J]. Biomed Khim,2020,66(5): 386-391.  
[4] HAGYMÁSI K,EGRESI A,LENGYEL G,et al. Factors affecting liver disease progression, with emphasis on the role of free radical reactions[J]. Orv Hetil,2020,161(35):1441-1448.  
[5] PARTHA M,NABIL E,MOHAMED A A,et al. Interplay of oxidative stress, inflammation, and autophagy: their role in tissue injury of the heart, liver, and kidney [J]. Oxid Med Cell Longev,2018,22:2090813.  
[6] SUN M N,SUN M J,ZHANG J Y. Osthole:an overview of its sources,biological activities,and modification development[J]. Med Chem Res,2021,30(10):1767-1794.  
[7] LOVEDEEP S,ANUDEEP K,SAWETA G,et al. Skimmetin/osthole mitigates pain-depression dyad via inhibiting inflammatory and oxidative stress-mediated neurotransmitter dysregulation[J]. Metab Brain Dis.,2021,36(1):111-121.  
[8] ZHAO X,XUE J,WANG X L,et al. Involvement of hepatic peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha/\gamma$  in the therapeutic effect of osthole on high-fat and high-sucrose-induced steatohepatitis in rats[J]. Int Immunopharmacol,2014,22(1):176-181.  
[9] 周文博,李皓.蛇床子素对他莫昔芬诱导的小鼠肝损伤保护作用的研究[J].南京医科大学学报,2019,40(3):127-138.  
[10] 刘英,徐永莉,冯世鑫,等.甜茶颗粒剂对小鼠急性肝损伤的保护作用研究[J].右江民族医学院学报,2020,42(2):155-158.  
[11] 张建军,谢梅林,王恒斌,等.蛇床子素对小鼠酒精性脂肪肝的治疗作用[J].苏州大学学报(医学版),2011,31(1):62-65,70.  
[12] 周红林,刘建新,周俐,等.蛇床子素对小鼠实验性肝损伤的干预效应[J].中国临床康复,2006,10(35):190-192.  
[13] 张放,汪玲红,王祥云,等.蛇床子素抑制 NLRP3 炎症体及对血管性痴呆大鼠的神经保护作用研究[J].科技视界,2021(33):96-98.  
[14] NATALIA K K,JUSTYNA T,MALGORZATA T,et al. Modulatory effects of osthole on lipopolysaccharides-induced inflammation in caco-2 cell monolayer and co-cultures with THP-1 and THP-1-derived macrophages [J]. Nutrients,2020,13(1):123.  
[15] FRANCESCO C,ELISABETTA Z,STEFANO I,et al. LKB1/AMPK pathway and drug response in cancer: a therapeutic perspective[J]. Oxid Med Cell Longev,2019: 8730816.  
[16] SAMANEH E,SONJA H,BEN L,et al. AKT/AMPK-mediated phosphorylation of TBC1D4 disrupts the interaction with insulin-regulated aminopeptidase[J]. J Biol Chem,2021,296:100637.

收稿日期:2022-05-19;修回日期:2022-06-08