

牛樟芝提取物调控 Nrf2/HO-1 通路对酒精性肝损伤的保护作用

冯彩玲¹ 杨彬君¹ 吴岩斌¹ 易骏² 吴锦忠¹ 吴建国¹

①福建中医药大学药学院 福建 福州 350122

②福建教育学院理科部 福建 福州 350001

摘要: 研究不同剂量(100、200和400mg/kg)的牛樟芝水提物(WE)、醇提后水提取物(WEE)和醇提物(EE)对酒精诱导的ICR小鼠急性肝损伤的保护作用和对Nrf2/HO-1抗氧化信号通路的影响。研究结果表明:与模型组比较,400mg/kg的WE和WEE均能显著抑制血清ALT和AST水平的升高,200mg/kg的WE和WEE分别显著降低血清ALT和AST含量。各剂量的WE、WEE和EE均能显著降低肝脏MDA含量,200和400mg/kg的WE和不同剂量的WEE均可明显提高肝脏的SOD和CAT活力。H&E染色结果表明WE、WEE和EE对酒精诱导的肝损伤均有一定的改善作用,EE处理组的效果相对较差。免疫组化染色结果表明各剂量的WE、WEE和EE均能促进Nrf2的核转位,诱导HO-1的表达,提高肝脏的抗氧化能力,对酒精诱导的急性肝损伤具有明显的保护作用。提示牛樟芝能通过调节Nrf2/HO-1抗氧化信号通路发挥解酒保肝功效。

关键词: 牛樟芝, 提取物, 酒精性肝损伤, Nrf2/HO-1 抗氧化信号通路, 保护作用

[引用本文] 冯彩玲, 杨彬君, 吴岩斌, 易骏, 吴锦忠, 吴建国, 2021. 牛樟芝提取物调控 Nrf2/HO-1 通路对酒精性肝损伤的保护作用. 菌物学报, 40(9): 2433-2444

Feng CL, Yang BJ, Wu YB, Yi J, Wu JZ, Wu JG, 2021. Hepatoprotective effects of extracts of *Taiwanofungus camphoratus* on liver with alcohol-induced injury through regulation of Nrf2/HO-1 signaling pathway. Mycosystema, 40(9): 2433-2444

基金项目: 国家自然科学基金(81700524); 福建省自然科学基金(2019J01341)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81700524) and Natural Science Foundation of Fujian Province (2019J01341).

✉ Corresponding author. E-mail: wjg1419@126.com

✉ Contributed equally to this work.

ORCID: WU Jian-Guo (0000-0001-6809-7169)

Received: 2021-03-30, accepted: 2021-04-30

Hepatoprotective effects of extracts of *Taiwanofungus camphoratus* on liver with alcohol-induced injury through regulation of Nrf2/HO-1 signaling pathway

FENG Cai-Ling¹ YANG Bin-Jun¹ WU Yan-Bin¹ YI Jun² WU Jin-Zhong¹ WU Jian-Guo¹

①School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China

②Department of Science, Fujian Institute of Education, Fuzhou, Fujian 350001, China

Abstract: Protective effects of different doses (100, 200 and 400mg/kg) of water extract (WE), water extract after extraction by ethanol (WEE) and ethanol extract (EE) of *Taiwanofungus camphoratus* on alcohol-induced acute liver injury in ICR mice, as well as Nrf2/HO-1 antioxidant signaling pathway were investigated. Compared with the model group, 400mg/kg dosage of both WE and WEE could inhibit the increase of serum ALT and AST levels significantly, and 200mg/kg of WE and WEE could obviously decrease the serum ALT and AST content, respectively. Different doses of WE, WEE and EE could significantly reduce the content of hepatic MDA; 200 and 400mg/kg of WE and different doses of WEE could markedly increase hepatic SOD and CAT activities. H&E staining observation indicated that WE, WEE and EE could mitigate alcoholic liver injury to a certain degree, but a relative lower effect was observed in EE-treated groups. The immunohistochemical staining results indicated that different dose of WE, WEE and EE could enhance the nuclear translocation of Nrf2 and promote the expression of HO-1 to improve the hepatic antioxidant capacity, thus presenting a significant protective effect on alcohol-induced acute liver injury. It was suggested that *Taiwanofungus camphoratus* exhibited drunkenness-alleviating and liver-protecting effects *via* regulating the Nrf2 antioxidant signaling pathway.

Key words: *Taiwanofungus camphoratus*, extracts, alcoholic liver injury, Nrf2/HO-1 antioxidant signaling pathway, protective effect

酒精性肝病 (alcoholic liver disease, ALD) 是由于长期大量饮酒导致的肝脏疾病。初期通常表现为脂肪肝, 进而可发展成酒精性肝炎、肝纤维化和肝硬化。严重酗酒时可诱发广泛肝细胞坏死, 甚至引起肝功能衰竭。酒精性肝病是我国常见的肝脏疾病之一, 严重危害身体健康 (中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组和中国医师协会脂肪性肝病专家委员会 2018)。ALD 的药物治疗进

展缓慢, 糖皮质激素是常用的治疗药物, 但此类药物的副作用限制其临床应用 (Liu *et al.* 2019)。因此, 从天然产物中寻找毒副作用小的保肝活性物质对 ALD 的预防与治疗具有重要的科学意义和临床应用价值。

研究表明活性氧 (ROS) 和氧化应激是诱发 ALD 的主要病理学机制 (Hou *et al.* 2019)。乙醇摄入体内后氧化代谢产生过量的 ROS, 通过靶向作用于肝细胞的重要生物成分, 如

DNA、脂质和蛋白质, 诱发氧化应激, 造成肝细胞死亡和组织损伤 (Cai *et al.* 2018)。因此, 诱导机体抗氧化酶活性, 降低氧化应激水平是治疗 ALD 的重要策略之一。转录因子 NF-E2 相关因子 2 (Nrf2) 是机体调节抗氧化应激反应的核心转录因子, 调节多种抗氧化途径。Nrf2 可以从细胞质转移到细胞核, 与抗氧化反应元件结合, 正向调节 II 相解毒酶和抗氧化酶等靶基因的表达, 从而有效改善氧化应激诱发的肝损伤。Nrf2 抗氧化信号通路在肝脏疾病的发生、发展及预防过程中起着非常重要的作用 (曹玲娟等 2015)。

牛樟芝 *Taiwanofungus camphoratus* (M. Zang & C.H. Su) Sheng H. Wu *et al.* 又称为樟生薄孔菌、牛樟菇、红樟芝、樟菇、樟菰、樟窟内菰 (戴玉成和李玉 2011; Wu *et al.* 2012), 是生长在我国台湾牛樟树腐朽心材内壁上的一种腐生真菌 (Geethangili & Tzeng 2011)。牛樟芝在我国台湾民间用于治疗肝病具有悠久的历史。我们的前期研究证实醇提后水提取物 (WEE) 和多糖对酒精诱导 HepG2 细胞氧化应激损伤具有明显的保护作用 (杨彬君等 2021)。于此, 本研究从 Nrf2/HO-1 抗氧化信号通路探讨牛樟芝不同提取物对酒精诱导的 ICR 小鼠急性肝损伤的体内保护作用, 以期明确牛樟芝解酒保肝的活性部位和潜在的分子作用机制, 为牛樟芝的开发利用提供实验参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 仪器: 4℃低温冰箱、-80℃低温冰箱 (青岛海尔股份有限公司); AF-103AS 雪花制冰机 [斯科茨曼制冰系统 (上海) 有限公司]; MS105DU 万分之一天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); 35-2 数显恒温加热磁力搅拌器 (上海梅香仪器有限公司); 生物组织包埋机、摊烤片

机 (湖北孝感亚光医用电子技术有限公司); RM235 组织切片机、生物显微镜 (德国 Leica 公司); TECAN M200 酶标仪 (瑞士帝肯集团公司); 低温高速冷冻离心机 (美国 Thermo Fisher 公司)。

1.1.2 药材和试剂: 牛樟芝 *Taiwanofungus camphoratus* 由汕头市君研生物科技有限公司提供, 经吴锦忠教授鉴定为多孔菌科、薄孔菌属牛樟芝子实体 (图 1)。牛樟芝不同提取物包括: 水提物 WE (water extraction, WE)、醇提后水提取物 (water extract after extraction by ethanol, WEE) 和醇提物 (ethanol extraction, EE) 按照杨彬君等 (2021) 的方法制备; 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na)、中性树脂 (国药集团化学试剂有限公司); 水飞蓟素 (上海源叶生物科技有限公司); 生理盐水 (福州海王福药制药有限公司); 多聚甲醛 (天津致远化学试剂有限公司); 无水乙醇 (西陇科学股份有限公司); 丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 测定试剂盒、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 测定试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒、丙二醛 (MDA) 测定试剂盒和过氧化氢酶 (CAT) 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 血红素氧合酶 (HO-1)、Nrf2 兔单克隆抗体 (美国 Abcam 公司); DAB 显色



图 1 牛樟芝子实体

Fig. 1 Fruiting bodies of *Taiwanofungus camphoratus*.

试剂盒、UltraSensitive™ S-P 超敏试剂盒(迈新生物科技有限公司);苏木素、伊红(北京索莱宝科技有限公司);组织包埋盒、显微镜盖玻片、粘附载玻片(江苏世泰实验器材有限公司)。

1.1.3 实验动物: ICR 小鼠 120 只,雌雄各半,体重(20 ± 2)g, SPF 级,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,实验动物许可证号:SCXK(沪)2017-0005,合格证编号:2015000547530-1,于福建中医药大学动物实验中心 SPF 级动物房内饲养。

1.2 酒精性肝损伤模型复制及分组给药处理

ICR 小鼠 120 只,分成 12 组(10 只/组),分别为正常组、模型组、阳性药组、WE、WEE 和 EE 低、中、高剂量组。小鼠经适应性喂养 1 周后,将 EE 和水飞蓟素溶于 0.4% CMC-Na, WE 和 WEE 溶于生理盐水中,灌胃给药。正常组和模型组给予生理盐水,阳性药组给予水飞蓟素(200mg/kg),各给药组给予不同提取物,分为低剂量组(100mg/kg)、中剂量组(200mg/kg)、高剂量组(400mg/kg),每天给药 1 次,连续给药 10d,第 10 天给药 1h 后,灌胃给予 50%乙醇(14mL/kg),禁食不禁水 18h 后,摘眼球取血,离心取血清。取肝组织,称重,切取肝组织左上叶于 4%多聚甲醛中固定,其余肝组织于液氮中冻存,备用。

1.3 血清和肝组织生化指标测定

取小鼠血清,于自动生化分析仪测定 ALT、AST 含量。取肝组织适量,生理盐水漂洗后进行称重,加生理盐水用匀浆器制成 10%的肝组织匀浆,4℃离心(5 000r/min) 10min,取上清液,按试剂盒说明书进行操作,测定肝组织中 MDA 含量和 SOD、CAT 活力。

1.4 肝组织切片及 H&E 染色

切取肝组织右上叶,常温下于 4%多聚甲醛中固定 48h。脱水、石蜡包埋、切片和苏

木素-伊红(H&E)染色后,在光学显微镜下进行观察并拍照(200×)。

1.5 免疫组化染色检测 Nrf2 核转位和 HO-1 表达

取包埋好的肝组织蜡块,切成 4μm 的薄片,脱蜡、复水。组织切片浸没于 10μmol/L 枸橼酸盐缓冲液中,微波加热 15min,修复结束后置于室温下冷却,PBS 洗涤 3 次,每次 5min。除去 PBS 液,每张切片滴加 1 滴过氧化物阻断溶液,室温下孵育 20min,PBS 洗涤 3 次,每次 5min。除去 PBS 液,滴加羊血清室温下封闭 25min。除去血清,滴加适量稀释后的抗体(HO-1、Nrf2 抗体分别以 1:100 的比例稀释),4℃孵育过夜。取出,恢复至室温后 PBS 洗涤 3 次,每次 5min,除去 PBS 液,滴加适量生物素标记的羊抗兔抗体,室温下孵育 20min,PBS 洗涤 3 次,每次 5min。除去 PBS 液,滴加适量链霉素抗生物素-过氧化物酶溶液,室温下孵育 20min,PBS 洗涤 3 次,每次 5min。除去 PBS 液,滴加适量新鲜配制的 DAB 溶液室温显色后,立即停止反应,蒸馏水冲洗。苏木素复染,脱水,透明,中性树脂封片,显微镜下观察(200×)。阳性表达判断是以细胞质或细胞核内出现棕黄色颗粒为标准,每张切片随机选取 6 个视野,对视野内的细胞核 Nrf2 阳性表达的细胞和总细胞进行计数,算出平均 Nrf2 核内阳性表达率。另外,采用 Motic Med 数码医学图像分析系统对 HO-1 阳性表达部位的积分光密度值进行分析。

1.6 数据统计与分析

实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS22.0 统计软件对实验数据进行统计分析。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验进行组间比较, $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 对血清 ALT 和 AST 含量影响

ALT、AST 为临床上应用最为广泛的反映肝损伤的生化指标,当肝细胞受到损伤时,细胞膜通透性发生改变,血清 ALT 含量升高,当线粒体进一步受到影响时,AST 开始升高(雷玮等 2017)。与空白组比较,模型组的 ALT 和 AST 含量显著升高 ($P<0.05$) (表 1)。与模型组比较,400mg/kg 的 WE 和 WEE 及 200mg/kg 的水飞蓟素(阳性药组)均能显著

表 1 牛樟芝不同提取物对血清 ALT、AST 含量的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 1 Effects on the serum ALT and AST content in ICR mice of different extracts of *Taiwanofungus camphoratus*

组别		谷丙转氨酶	谷草转氨酶
Groups		ALT (U/L)	AST (U/L)
空白组		40.13±3.55	107.07±18.71
Blank group			
模型组		47.27±2.83 [#]	165.27±5.35 [#]
Model group			
阳性药组		37.33±4.03 ^{**}	118.93±10.29 [*]
Positive drug group			
水提取物	100	51.15±18.46	140.70±27.44
WE (mg/kg)	200	41.35±1.06 [*]	124.25±30.33
	400	44.10±1.09 [*]	133.23±9.69 [*]
醇提后水提取物	100	49.30±18.6	173.75±41.29
WEE (mg/kg)	200	53.10±8.06	129.33±22.28 [*]
	400	38.60±7.38 [*]	114.05±15.54 [*]
醇提物	100	45.00±3.18	136.58±13.64
EE (mg/kg)	200	40.28±7.72	148.90±62.05
	400	54.67±29.05	175.47±60.50

注:与空白组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;水提取物(WE),醇提后水提取物(WEE),醇提物(EE)。下同

Note: [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$, versus blank group; ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$, versus model group; WE: Water extract; WEE: Water extract after extraction by ethanol; EE: Ethanol extract. The same below.

抑制血清 ALT 和 AST 水平的升高,200mg/kg 的 WE 和 WEE 分别显著降低血清 ALT 和 AST 含量,EE 给药组无明显变化 ($P>0.05$)。

2.2 对肝脏 SOD、MDA 和 CAT 水平的影响

与空白组比较,模型组肝脏的 SOD 和 CAT 水平极显著降低,MDA 含量极显著升高 ($P<0.01$) (表 2)。与模型组比较,200mg/kg 的水飞蓟素(阳性药组)能极显著提高肝脏 SOD 和 CAT 水平,降低 MDA 含量。WE 的中、高剂量组,WEE 各剂量组肝脏的 SOD 和 CAT 活力显著或极显著上升 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),不同剂量 EE 给药组肝脏的 SOD 和 CAT 活力则无显著差异 ($P>0.05$)。不同剂量的 WE、WEE 和 EE 给药组均能显著或极显著降低由酒精所致肝脏 MDA 含量的升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.3 对肝脏病理学改变的影响

肝组织的 H&E 染色结果见图 2,正常组小鼠的肝组织切片显示正常肝结构,中央静脉良好,保存完整的细胞核,肝细胞以中央静脉为中心,向四周呈放射状排列。与正常组比较,模型组给予酒精后,中央静脉周围的肝细胞水肿,出现脂肪变性、炎细胞浸润、肝索排列紊乱和肝小叶界限模糊等病理学病变;与模型组比较,阳性药组给予 200mg/kg 水飞蓟素能减轻肝细胞变性,有效改善肝小叶结构破坏及肝索紊乱;WE、WEE 和 EE 对酒精诱导的肝损伤均有一定的改善作用,其中 EE 处理组的效果相对较差。

2.4 对肝脏 Nrf2 和 HO-1 表达的影响

肝组织 Nrf2 表达免疫组化染色检测结果见图 3 和表 3, Nrf2 的阳性表达呈棕黄色颗粒。空白组主要在胞浆,可见 Nrf2 阳性表达;与空白组比较,模型组可见明显的细胞核 Nrf2 阳性表达 ($P<0.05$);与模型组比较,200mg/kg 的水飞蓟素阳性药组的细胞核 Nrf2 阳性表达率极显著增加 ($P<0.01$);不同

表 2 牛樟芝不同提取物对肝脏 SOD、MDA 和 CAT 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)Table 2 Effects on the SOD, MDA and CAT levels in mouse liver of different extracts of *Taiwanofungus camphoratus*

组别		超氧化物歧化酶	丙二醛	氧化氢酶
Groups		SOD (U/mg)	MDA (nmol/mg)	CAT (U/mg)
空白组		187.55±14.86	7.95±0.84	181.62±29.82
Blank group				
模型组		147.64±7.10 ^{###}	13.08±1.12 ^{###}	125.68±19.51 ^{##}
Model group				
阳性药组		171.20±7.98 ^{**}	9.21±1.96 ^{**}	194.51±36.70 ^{**}
Positive drug group				
水提取物	100	141.66±4.88	10.56±2.08 ^{**}	144.98±18.21
WE (mg/kg)	200	156.87±9.88 [*]	8.87±1.76 ^{**}	147.51±18.62 [*]
	400	157.54±9.30 [*]	10.05±1.63 ^{**}	146.98±14.57 [*]
醇提后水提取物	100	163.83±10.89 [*]	9.18±2.40 ^{**}	151.25±22.05 [*]
WEE (mg/kg)	200	175.49±10.15 ^{**}	8.31±2.96 ^{**}	166.11±23.76 ^{**}
	400	176.86±9.92 ^{**}	9.25±2.51 ^{**}	182.08±7.56 ^{**}
醇提物	100	146.46±9.72	9.90±2.53 ^{**}	130.64±15.08
EE (mg/kg)	200	146.39±9.70	10.05±3.40 [*]	124.42±14.73
	400	136.78±14.56	10.05±3.77 [*]	120.19±12.89

剂量的 WE、WEE 和 EE 各给药组的细胞核 Nrf2 阳性表达率较模型组极显著升高 ($P<0.01$); 与 WE 和 WEE 相比, EE 细胞核的 Nrf2 阳性表达相对较少; 提示在酒精诱导的氧化应激能激活 Nrf2 并发生核转位, WE、WEE 及 EE 各给药组均可以进一步促进 Nrf2 核转位, 而其中以 EE 的活性相对较弱。

肝组织 HO-1 表达免疫组化染色结果见图 4 和表 4, HO-1 的阳性表达呈棕黄色。空白组中 HO-1 少量表达。与空白组比较, 模型组 HO-1 的表达显著增加 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各给药组的 HO-1 表达量均极显著增加 ($P<0.01$)。表明酒精诱导的氧化应激能显著提高肝脏的 HO-1 表达, WE、WEE 及 EE 各给药组均能进一步促进酒精肝损伤后肝组织 HO-1 蛋白的表达, 其中 EE 的活性相对较

弱, 该结果与 Nrf2 免疫组化染色结果的趋势相一致。提示 WE、WEE 及 EE 各给药组均能促进 Nrf2 核转位, 诱导 HO-1 的表达, 提高肝脏的抗氧化应激能力, 从而对酒精性肝损伤起到保护作用。

3 讨论

牛樟芝为台湾特有珍贵药用真菌, 含有三萜、多糖、马来酸、琥珀酸衍生物、泛素衍生物、腺苷、多肽、酚类、甾醇类等, 具有良好护肝、解酒和解毒的功效 (Wu *et al.* 2019; Ren *et al.* 2020)。多项药效学研究表明牛樟芝菌丝或子实体对不同的生物或化学物质诱导的肝损伤均具有明显的保护作用, 如痤疮丙酸杆菌 (Han *et al.* 2006)、脂多糖 (Ker *et al.* 2014) 和四氯化碳 (Lin *et al.* 2006) 等。

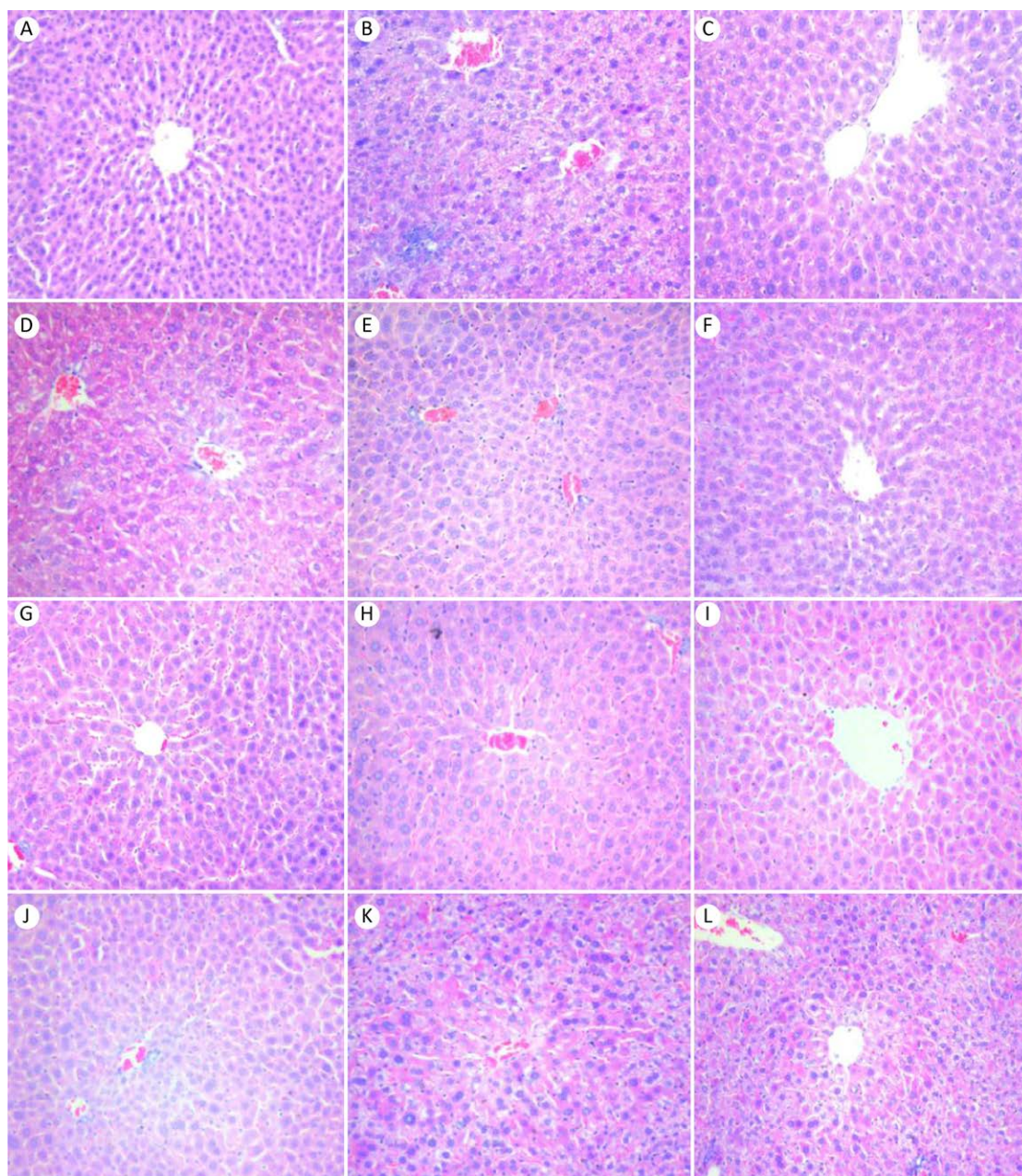


图 2 H&E 染色观察肝脏病理学变化情况 (200×) A: 空白组 (蒸馏水); B: 模型组 (蒸馏水+14mL/kg 50%无水乙醇); C: 阳性药组 (200mg/kg 水飞蓟素+14mL/kg 50%无水乙醇); D–F: WE 低、中、高剂量组 (100、200 或 400mg/kg WE+14mL/kg 50%无水乙醇); G–I: WEE 低、中、高剂量组 (100、200 或 400mg/kg WEE+14mL/kg 50%无水乙醇); J–L: EE 低、中、高剂量组 (100、200 或 400mg/kg EE+14mL/kg 50%无水乙醇)。下同

Fig. 2 The pathological changes of mouse liver observed by H&E staining (200×). A: Blank group (distilled water); B: Model group (distilled water+14mL/kg 50% alcohol); C: Positive drug group (200mg/kg bifendate+14mL/kg 50% alcohol); D–F: WE low, medium and high dose group (100, 200 and 400mg/kg WE+14mL/kg 50% alcohol); G–I: WEE low, medium and high dose group (100, 200 and 400mg/kg WEE+14mL/kg 50% alcohol); J–L: EE low, medium and high dose group (100, 200 and 400mg/kg EE+14mL/kg 50% alcohol). The same below.

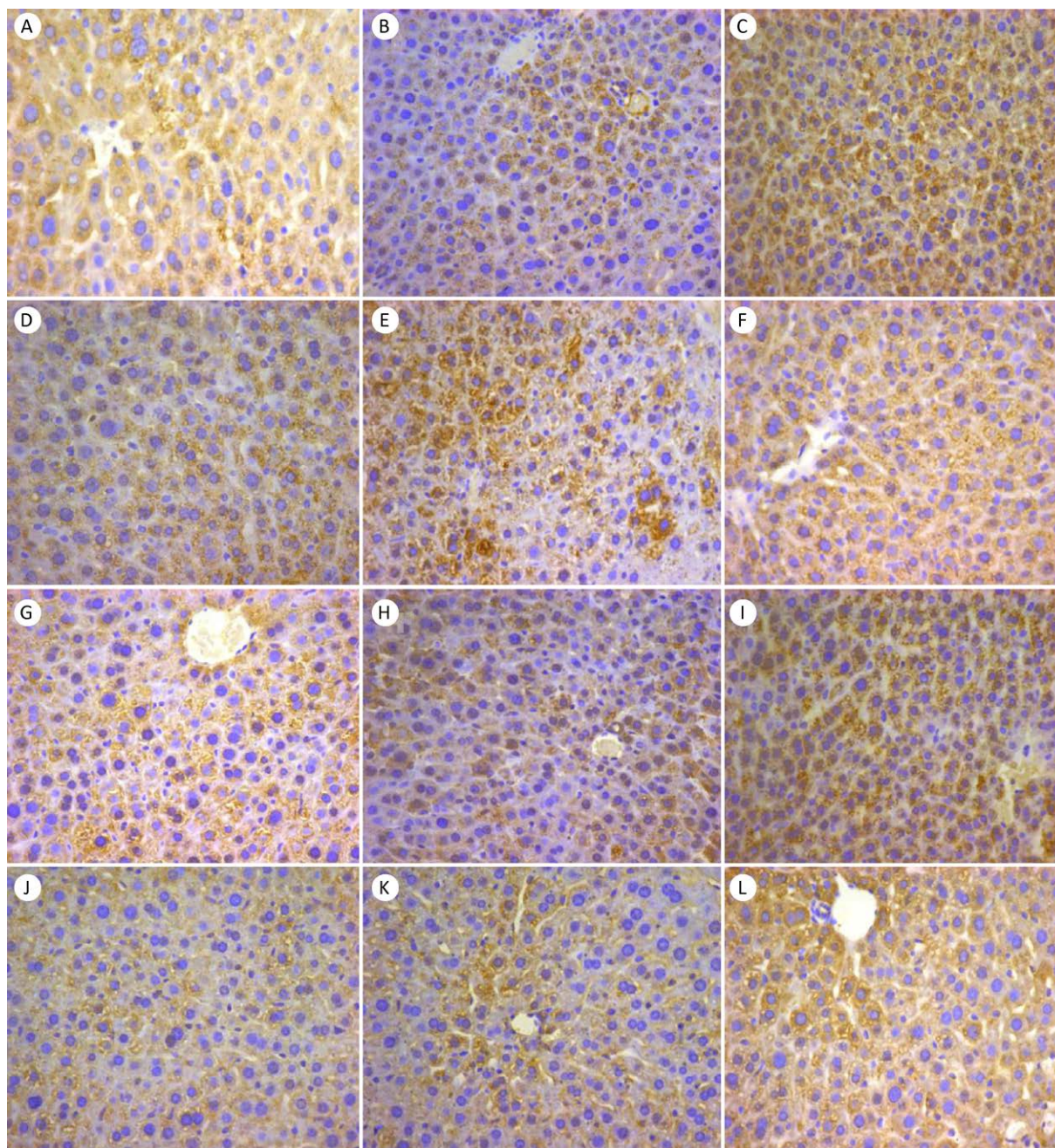


图 3 免疫组化染色观察肝脏 Nrf2 表达情况 (200×)

Fig. 3 The expression of Nrf2 in mouse liver observed by immunohistochemical staining (200×).

此外,牛樟芝菌丝与孢子 (Dai *et al.* 2003)、子实体 (Huang *et al.* 2010)、黄褐色粉末状内容物 (王瑾等 2014)、菌丝水提物 (Ho *et al.* 2008)、菌丝化学成分 Antrodin A (Yi *et al.* 2020) 等被发现对酒精性肝损伤具有良好的改善作用。前期研究系统地比较了牛樟芝不

同提取物对 HepG2 细胞酒精性氧化损伤的影响,结果发现牛樟芝中的多糖和醇提后水提物具有明显的体外保护作用 (杨彬君等 2021)。因此,本研究进一步探究牛樟芝不同提取物包括 WE、WEE 和 EE 对酒精性急性肝损伤的体内保护作用及潜在的作用机制。

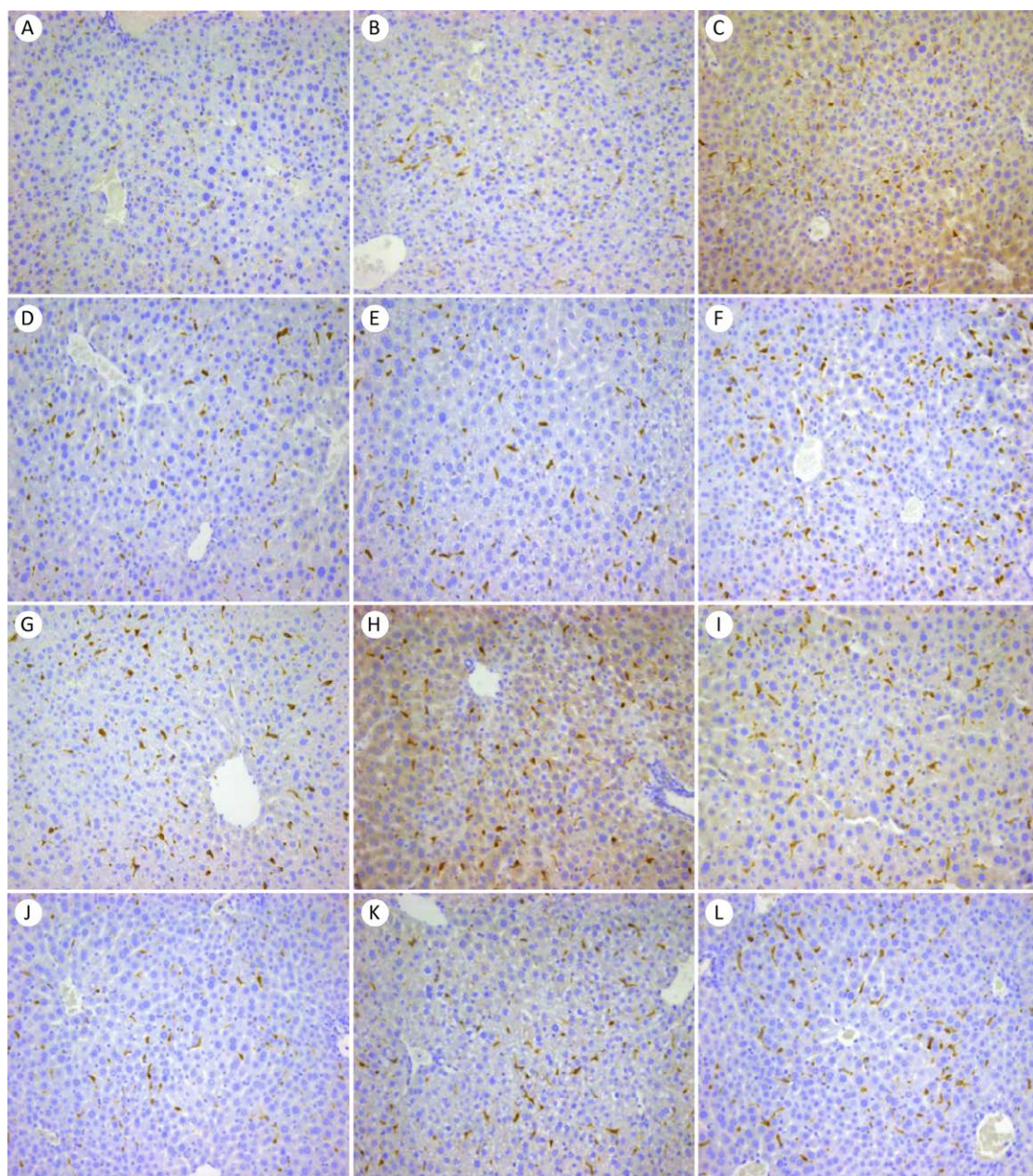


图 4 免疫组化染色观察肝脏 HO-1 表达情况 (200×)

Fig. 4 The expression of HO-1 in mouse liver observed by immunohistochemical staining (200×).

Nrf2 是调节氧化应激反应的重要转录因子,是外源性有毒物质和氧化应激的感受器,在参与细胞抗氧化应激和外源性有毒物质诱导的主要防御机制中发挥重要的作用。正常生理状态下与胞浆蛋白伴侣分子(Keap1)结合使活性处于相对抑制状态。在氧化应激(ROS 或亲电试剂)条件下,Keap1 上的半胱

氨酸残基被氧化还原修饰,Nrf2 被激活与 Keap1 解耦联合后转移入核内,Nrf2 上的 bZIP 结构能与小 Maf 蛋白结合形成异二聚体识别抗氧化反应元件上 DNA 基因序列并与之结合,转录激活调控下游的 HO-1 等抗氧化基因的表达,增加细胞对氧化应激和亲电子化学物质的抗性(Saito 2013)。HO-1 被认为是细

表 3 Nrf2 肝细胞核内阳性表达率

Table 3 Positive expression ratio in hepatocyte nucleus of Nrf2

组别	阳性表达率
Groups	Positive expression ratio (%)
空白组 Blank group	15.29±2.17
模型组	23.29±1.80 [#]
Model group	
阳性药组	87.36±3.50 ^{**}
Positive drug group	
水提物	100 71.48±2.23 ^{**}
WE (mg/kg)	200 74.85±3.32 ^{**}
	400 79.98±4.45 ^{**}
醇提后水提取物	100 56.52±2.33 ^{**}
WEE (mg/kg)	200 69.91±5.87 ^{**}
	400 77.93±4.48 ^{**}
醇提物	100 38.18±3.88 ^{**}
EE (mg/kg)	200 38.21±5.47 ^{**}
	400 48.60±7.76 ^{**}

表 4 免疫组化图像分析肝脏 HO-1 表达情况

Table 4 The expression of HO-1 in mouse liver by immunohistochemical image analysis

组别	阳性积分值
Groups	Positive integral values
空白组 Blank group	1 538.32±337.71
模型组 Model group	4 807.68±474.03 [#]
阳性药组 Positive drug group	10 199.33±1 329.53 ^{**}
水提物	100 10 486.30±1 773.63 ^{**}
WE (mg/kg)	200 13 544.60±2 397.79 ^{**}
	400 15 731.31±2 905.26 ^{**}
醇提后水提取物	100 10 944.46±704.58 ^{**}
WEE (mg/kg)	200 12 050.35±1 984.63 ^{**}
	400 13 596.04±3 423.06 ^{**}
醇提物	100 7 812.45±672.11 [*]
EE (mg/kg)	200 7 817.44±808.60 [*]
	400 10 973.47±502.93 ^{**}

胞氧化应激过程中一个非常敏感的指标。HO-1 与其催化血红素的降解产物 CO、胆红素和铁蛋白共同组成了机体重要的内源性保护系统,广泛参与多种急慢性氧化应激损伤。多种生长因子、氧化刺激因素、抗氧化药物等均能上调 HO-1 的表达 (李侑埕等 2021),酒精诱导的氧化应激可以活化肝细胞 Nrf2,核内 Nrf2 水平及 Nrf2 调控基因 HO-1 的表达均增加 (曹玲娟等 2015)。越来越多的证据表明,激活 Nrf2/HO-1 抗氧化信号通路,可以增强肝脏的抗氧化应激能力,对酒精等诱导的氧化应激肝损伤的治疗有重要意义 (Shu *et al.* 2019)。

本研究结果表明酒精诱导 WE 及 WEE 干预能显著降低血清 ALT 和 AST 含量,提高肝组织 SOD、CAT 的活性,降低肝脏 MDA 的含量,增强肝组织抗氧化应激的功能,改善酒精引起的急性肝损伤。免疫组化染色结果表明牛樟芝 WE、WEE 和 EE 不同提取物均可以促进 Nrf2 的核转位,诱导 HO-1 蛋白表达,从而提高机体抗氧化应激水平。EE 虽然能促进 Nrf2 核转位,提高 HO-1 表达,降低肝脏 MDA 含量,表现出一定的保肝活性,但是相对弱于 WE 和 WEE。本研究结果提示牛樟芝不同提取物均可通过激活 Nrf2/HO-1 抗氧化信号通路发挥酒精性肝损伤的保护作用,其保肝物质基础有待进一步研究。

[REFERENCES]

Cai Z, Song L, Qian B, Xu W, Ren J, Jing P, Oey I, 2018. Understanding the effect of anthocyanins extracted from purple sweet potatoes on alcohol-induced liver injury in mice. Food Chemistry, 245: 463-470

Cao LJ, Gong H, Miao Y, Li HD, Sun L, 2015. Research progress on Nrf2-ARE signaling pathway involved in liver disease pathological mechanism. Chinese

- Pharmacological Bulletin, 31(8): 1057-1061 (in Chinese)
- Dai YC, Li Y, 2011. Notes on the nomenclature of six important medicinal fungi in China. *Mycosystema*, 30(4): 515-518 (in Chinese)
- Dai YY, Chuang CH, Tsai CC, Sio HM, Huang SC, Chen JC, Hu ML, 2003. The protection of *Antrodia camphorata* against acute hepatotoxicity of alcohol in rats. *Journal of Food & Drug Analysis*, 11(3): 177-185
- Geethangili M, Tzeng YM, 2011. Review of pharmacological effects of *Antrodia camphorata* and its bioactive compounds. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2011: 212641
- Han HF, Nakamura N, Zuo F, Hirakawa A, Yokozawa T, Hattori M, 2006. Protective effects of a neutral polysaccharide isolated from the mycelium of *Antrodia cinnamomea* on *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide induced hepatic injury in mice. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 54(4): 496-500
- Ho YC, Lin MT, Duan KJ, Chen YS, 2008. The hepatoprotective activity against ethanol-induced cytotoxicity by aqueous extract of *Antrodia cinnamomea*. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 39(5): 441-447
- Hou R, Liu X, Yan J, Xiang K, Wu X, Lin W, Chen G, Zheng M, Fu J, 2019. Characterization of natural melanin from *Auricularia auricula* and its hepatoprotective effect on acute alcohol liver injury in mice. *Food & Function*, 10(2): 1017-1027
- Huang CH, Chang YY, Liu CW, Kang WY, Lin YL, Chang HC, Chen YC, 2010. Fruiting body of niuchangchih (*Antrodia camphorata*) protects livers against chronic alcohol consumption damage. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 58(6): 3859-3866
- Ker YB, Peng CC, Chang WL, Chyau CC, Peng RY, 2014. Hepatoprotective bioactivity of the glycoprotein, antrodan, isolated from *Antrodia cinnamomea* mycelia. *PLoS One*, 9(4): e93191
- Lei W, Wang DD, Ge GB, Sun J, 2017. Serum biomarkers of liver injury. *Journal of Practice Hepatology*, 20(2): 252-256 (in Chinese)
- Li YC, Chen LG, Kong R, Liang GB, 2021. Sodium aescinate improves early brain injury after subarachnoid hemorrhage through regulating Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathway to inhibit neurons apoptosis. *Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine*, 38(4): 779-785 (in Chinese)
- Lin WC, Kuo SC, Lin WL, Fang HL, Wang BC, 2006. Filtrate of fermented mycelia from *Antrodia camphorata* reduces liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 12(15): 2369-2374
- Liu X, Hou R, Yan J, Xu K, Wu X, Lin W, Zheng M, Fu J, 2019. Purification and characterization of *Inonotus hispidus* exopolysaccharide and its protective effect on acute alcoholic liver injury in mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129: 41-49
- National Workshop on Fatty Liver and Alcoholic Liver Disease, Chinese Society of Hepatology, Chinese Medical Association; Fatty Liver Expert Committee, Chinese Medical Doctor Association, 2018. Guidelines of prevention and treatment for alcoholic liver disease: a 2018 update. *Journal of Clinical Hepatology*, 34(5): 939-946 (in Chinese)
- Ren Y, Li HX, Zhou L, Lu ZM, Shi J, Geng Y, Xu ZH, 2020. Protective effect of spore powder of *Antrodia camphorata* ATCC 200183 on CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Nutrients*, 12(9): 2778
- Saito H, 2013. Toxicopharmacological perspective of the Nrf2-Keap1 defense system against oxidative stress in kidney diseases. *Biochemical Pharmacology*, 85(7): 865-872
- Shu G, Qiu Y, Hao J, Fu Q, Deng X, 2019. Nuciferine alleviates acute alcohol-induced liver injury in mice: roles of suppressing hepatic oxidative stress and inflammation via modulating

- mir-144/nrf2/ho-1 cascade. Journal of Functional Foods, 58: 105-113
- Wu F, Zhou LW, Yang ZL, Bau T, Li TH, Dai YC, 2019. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species. Fungal Diversity, 98: 1-76
- Wu SH, Kirk PM, Redhead SA, Stalpers JA, Dai YC, Norvell LL, Yang ZL, Ryvarden L, Su CH, Li Y, Zhuang WY, Yao YJ, Chen CJ, Chen LC, Yu ZH, Wang XC, 2012. Resolution of the nomenclature for niu-chang-chih (*Taiwanofungus camphoratus*), an important medicinal polypore. Taxon, 61(6): 1305-1310
- Yang BJ, Feng CL, Wu YB, Yi J, Wu JZ, Wu JG, 2021. Protective effect of *Taiwanofungus camphoratus* polysaccharides on alcohol-induced oxidative injury in HepG2 cells. Mycosystema, 40(6): 1549-1560 (in Chinese)
- Yi ZW, Xia YJ, Liu XF, Wang GQ, Xiong ZQ, Ai LZ, 2020. Antrodin A from mycelium of *Antrodia camphorata* alleviates acute alcoholic liver injury and modulates intestinal flora dysbiosis in mice. Journal of Ethnopharmacology, 254: 112681
- [附中文参考文献]
- 曹玲娟, 龚慧, 颜苗, 李焕德, 孙莉, 2015. Nrf2-ARE 信号通路参与肝脏疾病病理机制研究进展. 中国药理学通报, 31(8): 1057-1061
- 戴玉成, 李玉, 2011. 中国六种重要药用真菌名称的说明. 菌物学报, 30(4): 515-518
- 雷玮, 王丹丹, 葛广波, 孙杰, 2017. 肝损伤血清标志物研究进展. 实用肝脏病杂志, 20(2): 252-256
- 李侑埕, 陈立刚, 孔睿, 梁国标, 2021. 七叶皂苷钠通过调节 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路抑制神经元细胞凋亡改善蛛网膜下腔出血后的早期脑损伤. 广州中医药大学学报, 38(4): 779-785
- 杨彬君, 冯彩玲, 吴岩斌, 易骏, 吴锦忠, 吴建国, 2021. 牛樟芝多糖对 HepG2 细胞酒精性氧化损伤的保护作用. 菌物学报, 40(6): 1549-1560
- 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组, 中国医师协会脂肪性肝病专家委员会, 2018. 酒精性肝病防治指南 (2018 年更新版). 临床肝胆病杂志, 34(5): 939-946

(本文责编: 韩丽)