

山楂酸对H₂O₂诱导的BRL-3A细胞氧化损伤及p38和Nrf2/HO-1通路的影响

李桂兰* 郑开丰 秦韶刚 陈磊 岳彩霞 郭永琪
(山西农业大学动物科技学院, 晋中 030801)

摘要 该文研究了山楂酸对H₂O₂诱导的BRL-3A肝细胞氧化损伤的保护作用及其机制。采用MTT法检测细胞活力, DCFH-DA荧光探针法测定细胞的ROS水平, 微量酶标法测定细胞LDH、SOD、CAT的活力和GSH、MDA含量; 反转录PCR测定细胞*Nrf2*、*HO-1*和*p38*的mRNA表达水平; Western blot检测*Nrf2*、*HO-1*和p-p38的蛋白表达水平。结果显示, 山楂酸可改善H₂O₂导致的BRL-3A细胞活力下降, 降低ROS水平和LDH渗漏, 提高SOD、CAT的活性和GSH含量, 降低MDA的水平。此外, 山楂酸可促进*Nrf2*的核转位, 提高*HO-1*的mRNA和蛋白表达水平, 抑制p38的磷酸化水平。这些结果表明, 山楂酸对H₂O₂诱导的BRL-3A细胞的氧化损伤有保护作用, 其机制与促进*Nrf2*的核转位、上调*HO-1*的表达和抑制p38的磷酸化水平可能相关。

关键词 山楂酸; BRL-3A细胞; p38; 核因子E2相关因子2; 血红素氧化酶-1

Effects of Maslinic Acid on H₂O₂-Induced Oxidative Injury and Pathway of p38 and Nrf2/HO-1 in BRL-3A Cells

LI Guilan*, ZHENG Kaifeng, QIN Shaogang, CHEN Lei, YUE Caixia, GUO Yongqi
(College of Animal Science and Technology, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China)

Abstract In the paper, the protective effect and the mechanism of maslinic acid on oxidative injury of BRL-3A cells induced by H₂O₂ were investigated. Cell viability was determined by MTT. The intracellular ROS levels were measured using DCFH-DA. The activities of LDH, SOD and CAT as well as the contents of GSH and MDA were assayed by micro-enzyme-linked method. The mRNA levels of *Nrf2*, *HO-1* and *p38* were investigated by reverse transcription polymerase chain reaction. Western blot was used to evaluate the protein levels of *Nrf2*, *HO-1* and p-p38. The results showed that maslinic acid attenuated the cell viability loss, the intracellular ROS levels and LDH leakage induced by H₂O₂. The activities of SOD and CAT, the GSH content were increased, but the level of MDA was reduced by maslinic acid. In addition, the nuclear translocation of *Nrf2* could be promoted. The expression of *HO-1* both in mRNA level and protein level was up-regulated. The phosphorylation of p38 was inhibited by maslinic acid. These results suggested that maslinic acid protected against H₂O₂-induced oxidative injury in BRL-3A cells, and its mechanism was probably associated with the promotion of *Nrf2* nuclear

收稿日期: 2019-12-12 接受日期: 2020-02-10

国家自然科学基金(批准号: 31301452)、山西农业大学引进人才科研启动基金(批准号: XB2012013)和山西农业大学科技创新基金(批准号: 201313)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18234425190, E-mail: LGL_NJ@126.com

Received: December 12, 2019 Accepted: February 10, 2020

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31301452), the Scientific Research Foundation of Talent introduction of Shanxi Agricultural University (Grant No.XB2012013) and the Science and Technology Innovation Fund of Shanxi Agricultural University (Grant No.201313)

*Corresponding author. Tel: +86-18234425190, E-mail: LGL_NJ@126.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5200>

translocation, the up-regulation of HO-1 expression and the inhibition of p38 phosphorylation.

Keywords maslinic acid; BRL-3A cell; p38; Nrf2; HO-1

氧化应激是指生物机体氧化和抗氧化不平衡导致生物学损伤的病理学过程^[1]。氧化应激时体内的高活性分子活性氧(reactive oxygen species, ROS)大量形成,直接攻击生物大分子,进而引起细胞结构和功能的异常^[2]。研究表明,氧化应激能导致肝细胞损伤,成为肝脏疾病发生、发展的重要机制^[3-4]。

核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2)是细胞中重要的内源性抵御氧化应激的转录因子。生理条件下, Nrf2在细胞质中与细胞骨架相关蛋白Keap1结合处于非活性、易降解的状态。氧化应激状态下, Nrf2与Keap1解离而活化,活化的Nrf2转位入核,与小Maf蛋白或转录活化因子4(activating transcription factor-4, ATF-4)结合形成异二聚体,进而诱导一系列抗氧化基因如血红素氧化酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)的表达,发挥抗氧化应激作用^[5]。研究表明, Nrf2/HO-1信号通路在植物提取物对各种因素导致的肝脏应激损伤过程中发挥重要作用^[6-7]。

山楂酸(maslinic acid, MA)是一种五环三萜酸,广泛地存在于多种可食用的天然植物中,尤其在橄榄和山楂中含量丰富^[8]。研究发现,山楂酸具有较好的抗氧化活性^[9-10]。近年来的研究表明,山楂酸能通过抑制p38 MAPK通路对酒精诱导的肝脏氧化应激和炎性损伤起保护作用^[11],山楂酸也能有效拮抗脂多糖/D-半乳糖胺引起的小鼠急性肝损伤^[12]。本研究以H₂O₂诱导BRL-3A肝细胞建立氧化损伤模型,探讨p38和Nrf2/HO-1通路与山楂酸保护氧化损伤细胞之间的关系,以评价山楂酸的体外抗氧化能力,探索其抗氧化机制,为山楂酸作为天然抗氧化剂的新资源开发和利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

正常大鼠肝细胞株(BRL-3A)购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库;山楂酸(CAS: 4373-41-5, 纯度≥98%, HPLC)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT]、2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(2',7'-Dichlorodihydrofluo-

rescein diacetate, DCFH-DA)购自Sigma公司; DMEM高糖培养基购自HyClone公司;胎牛血清购自中国杭州四季青生物技术有限公司;乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、丙二醛(malonaldehyde, MDA)测定试剂盒和BCA蛋白含量测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;细胞核与细胞质抽提试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; Nrf2、HO-1抗体购自Abcam公司; p38、p-p38、Lamin B抗体购自北京博奥森生物技术有限公司; β-actin抗体购自北京中杉金桥生物公司; HRP标记山羊抗小鼠IgG、山羊抗兔IgG、显影粉、定影粉、RNA提取试剂盒和DNA Marker购自北京康为世纪生物技术有限公司;超敏ECL底物反应液、NC膜购自武汉博士德生物工程有限公司;蛋白marker购自Thermo Fisher公司; PCR引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成; RNA反转录试剂盒购自TaKaRa公司; 2× Taq PCR Mix购自中科瑞泰生物技术有限公司; 其余试剂均为国产分析纯以上。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 BRL-3A细胞在10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中, 37 °C、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。

1.2.2 细胞分组及药物处理 将BRL-3A细胞随机分为3组: 对照组、H₂O₂模型组和山楂酸组, 每组至少设3个重复孔。对照组: 始终以含10%胎牛血清的完全培养基培养。H₂O₂模型组: 以含0.4 mmol/L H₂O₂的完全培养基培养8 h。山楂酸组: 不同浓度的山楂酸预处理30 min后, 再用含0.4 mmol/L H₂O₂和相应浓度山楂酸的完全培养基继续培养8 h。

1.2.3 细胞活力的测定 将细胞接种至96孔培养板中, 完全培养基培养, 待细胞贴壁生长良好后, 按实验分组和不同浓度(5、10、15、20、25、30 μmol/L)的山楂酸单独刺激肝细胞8 h进行实验, 每组6孔。培养结束后, 吸弃96孔板中培养基, PBS清洗残留的培养基, 每孔加入20 μL 5 mg/mL MTT, 37 °C继续培养4 h。弃掉MTT液, 每孔加入150 μL DMSO, 振荡作用10 min, 酶标仪上570 nm波长处检测吸光度(D)

值,以对照组为100%计算细胞活力(%)。

1.2.4 ROS水平的测定 取对数生长期的细胞接种于6孔板,完全培养基培养,待细胞贴壁生长良好后,按实验分组进行实验。培养结束后,吸出培养基,PBS洗掉残留培养基,用含10 μmol/L DCFH-DA的培养基于37 °C避光孵育30 min, PBS清洗3次,酶标仪上在激发波长为485 nm和发射波长为530 nm的条件下读数,记录结果,以正常对照为100%计算ROS(% of control),进行结果分析。

1.2.5 LDH活力的测定 取对数生长期的细胞接种于96孔板,药物作用后按照LDH试剂盒说明书操作,在420 nm处测定细胞上清中LDH的活力,其中以正常对照为100%计算LDH的值(100% of control)。

1.2.6 SOD、CAT的活力和GSH、MDA含量测定 取对数生长期的细胞接种于6孔板,药物作用后按照SOD、CAT、GSH和MDA试剂盒的使用说明,在反应体系中SOD抑制率达50%时所对应的酶量为一个SOD活力单位(U),按照每毫升样品每秒钟分解1 μmol的H₂O₂的量作为一个CAT活力单位(U)。SOD和CAT分别以U·mg⁻¹·prot⁻¹、U·mL⁻¹为单位,GSH和MDA分别以μmol·mg⁻¹·prot⁻¹、nmol·mg⁻¹·prot⁻¹为单位,测定细胞中SOD、CAT的活力和GSH、MDA的含量。

1.2.7 肝细胞中Nrf2、HO-1和p38的mRNA检测 取对数生长期的细胞接种于6孔板,药物作用后根据RNA提取试剂盒提取细胞总RNA,根据反转录试剂盒反转录生成cDNA,以cDNA为模板,进行RT-PCR反应,反应条件为:95 °C预变性5 min;95 °C变性30 s,60 °C退火30 s,72 °C延伸1 min,共40个循环;72 °C延伸5 min。Nrf2上游引物为:5'-TTC CAT TTA CGG AGA CCC AC-3',下游引物为:5'-ATT CAC GCA TAG GAG CAC TG-3';HO-1上游引物为:5'-CAG GTG ATG CTG ACA GAG GA-3',下游引物为:5'-ACA GGA AGC TGA GAG TGA GG-3';p38上游引物为:5'-GCA ACC TCG CTG TGA ATG AAG A-3',下游引物为:5'-CAC GTA GCC GGT CAT TTC GTC-3';β-actin上游引物为:5'-CAC GAT GGA GGG GCC GGA CTC ATC-3',下游引物为:5'-TAA AGA CCT CTA TGC CAA CAC AGT-3'^[13-14]。

1.2.8 肝细胞中Nrf2、HO-1、p38和p-p38蛋白检测 取对数生长期的细胞接种于6孔板,药物作用后RIPA裂解细胞提取细胞总蛋白,再根据细胞质与细胞核

蛋白提取试剂盒分别提取细胞核与细胞质蛋白。取等量蛋白样品进行SDS-PAGE电泳分离,转膜后,用5%脱脂奶粉室温封闭2 h,一抗4 °C孵育过夜,回收一抗,HRP标记的二抗室温孵育1 h,洗膜,ECL法曝光。采用Image J对蛋白条带进行定量分析。

1.3 数据分析

采用SPSS 22软件进行数据分析,所有数值均表示为 $\bar{x}\pm s$ 并设置多个重复,采用t检验或One-Way ANOVA进行统计学分析, $P<0.05$ 表示具有显著性差异, $P<0.01$ 表示具有极显著性差异。

2 结果分析

2.1 山楂酸对H₂O₂损伤BRL-3A细胞活力的影响

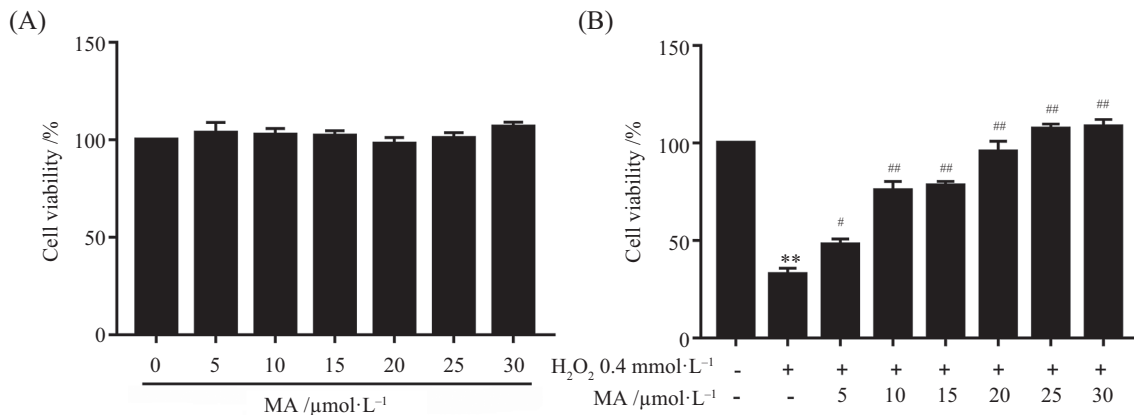
分别采用6个不同浓度的山楂酸(5、10、15、20、25、30 μmol/L)处理BRL-3A细胞8 h,结果发现,与对照组相比,5~30 μmol/L山楂酸对细胞活力无显著影响($P>0.05$),表明5~30 μmol/L山楂酸对肝细胞无明显的细胞毒性(图1A)。H₂O₂能显著降低BRL-3A细胞活性($P<0.01$),与模型组相比,5 μmol/L的山楂酸可显著提高肝细胞活力($P<0.05$),在10~30 μmol/L的浓度范围内可剂量依赖性地提高BRL-3A肝细胞活力,在统计学上具有极显著差异($P<0.01$)(图1B)。

2.2 山楂酸对H₂O₂诱导的BRL-3A细胞ROS水平的影响

为了探讨山楂酸对H₂O₂损伤的BRL-3A细胞的保护机制,采用DCFH-DA检测山楂酸对细胞中ROS水平的影响。图2的结果发现,与对照组相比,H₂O₂刺激的模型组ROS水平显著增加($P<0.01$),而与H₂O₂模型组相比,不同浓度(10、15、20 μmol/L)的山楂酸干预后,ROS水平显著降低($P<0.01$),说明山楂酸可降低H₂O₂刺激下胞内的ROS水平。

2.3 山楂酸抑制H₂O₂损伤的BRL-3A细胞中LDH的渗漏

由图3A可知,不同浓度(5、10、15、20、25、30 μmol/L)的山楂酸单独刺激BRL-3A细胞,对细胞培养液中的LDH活力无显著影响($P>0.05$)。图3B所示,与对照组相比,H₂O₂模型组细胞培养液中的LDH活力显著增加($P<0.01$),表明细胞受到明显损伤。山楂酸可显著抑制由H₂O₂引起的BRL-3A细胞LDH渗漏的增加,且在10~20 μmol/L的浓度范围内呈一定的剂量依赖性。结果表明,山楂酸对H₂O₂诱导的BRL-3A细胞损伤有一定的保护作用。

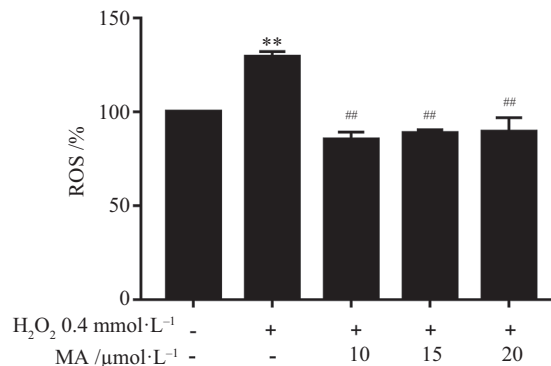


A: 不同浓度山楂酸对BRL-3A细胞活力的影响; B: 不同浓度山楂酸对H₂O₂损伤的BRL-3A细胞活力的保护作用。n=6; **P<0.01, 与对照组相比; #P<0.05, ##P<0.01, 与模型组相比。

A: effects of different concentrations of MA on the cell viability in BRL-3A cells; B: protective effects of different concentrations of MA on H₂O₂-induced cell viability loss in BRL-3A cells. n=6; **P<0.01 compared with the control group; #P<0.05, ##P<0.01 compared with the model group.

图1 不同浓度的山楂酸对BRL-3A细胞活力的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of MA on the cell viability in BRL-3A cells



n=3; **P<0.01, 与对照组相比; ##P<0.01, 与模型组相比。

n=3; **P<0.01 compared with the control group; ##P<0.01 compared with the model group.

图2 山楂酸对H₂O₂诱导的BRL-3A细胞内ROS水平的抑制作用

Fig.2 Inhibitory effects of MA on ROS levels in H₂O₂-induced BRL-3A cells

2.4 山楂酸对肝细胞中SOD、CAT活力以及GSH、MDA含量的影响

由图4可见, 与对照组相比, H₂O₂刺激后模型组的SOD、CAT活力和GSH含量均下降, 差异具有统计学意义(P<0.01), 山楂酸可不同程度地拮抗由H₂O₂引起的SOD、CAT活力和GSH含量的降低。MDA是脂质过氧化的终产物, H₂O₂作用后, BRL-3A细胞的MDA含量显著升高(P<0.01), 10 $\mu\text{mol/L}$ 的山楂酸作用可降低MDA的含量(P<0.05), 15~25 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围可极显著降低MDA的含量(P<0.01), 且呈一定的剂量依赖性。

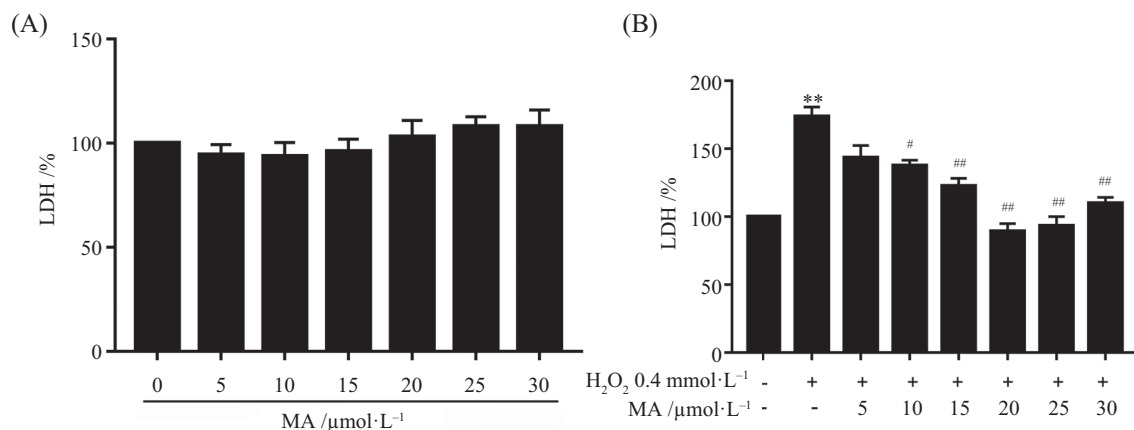
2.5 山楂酸对肝细胞中Nrf2、HO-1和p38 mRNA表达的影响

结果如图5所示, 与对照组相比, H₂O₂作用下

模型组的Nrf2、HO-1和p38 mRNA表达水平显著升高(P<0.01); 而山楂酸单独刺激组的HO-1和Nrf2 mRNA表达水平也显著增高(P<0.01), p38 mRNA无显著变化(P>0.05)。与H₂O₂模型组相比, 山楂酸干预后, HO-1和Nrf2 mRNA表达量持续显著增加, 而对p38 mRNA表达有明显的抑制作用(P<0.01), 并都呈现出剂量依赖性。结果表明, 山楂酸能上调H₂O₂诱导的HO-1和Nrf2 mRNA表达水平, 下调H₂O₂诱导的p38 mRNA表达水平。

2.6 山楂酸对肝细胞中Nrf2、HO-1和p-p38蛋白表达水平的影响

图6的结果显示, 与对照组相比, H₂O₂刺激后模型组的HO-1蛋白表达水平显著上升(P<0.05), 核内Nrf2蛋白表达水平显著升高(P<0.01), 胞质内的Nrf2

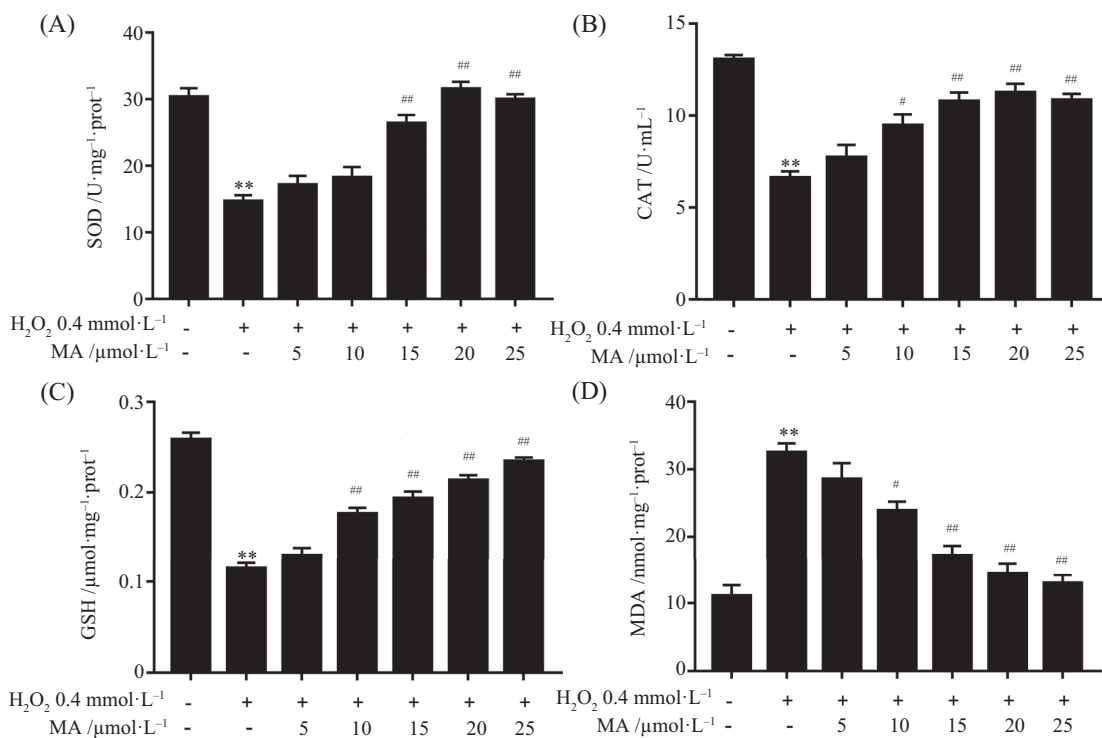


A: 不同浓度山楂酸对BRL-3A细胞LDH活性的影响; B: 不同浓度山楂酸抑制H₂O₂诱导的BRL-3A细胞LDH的渗漏。n=6; **P<0.01, 与对照组相比; #P<0.05, ##P<0.01, 与模型组相比。

A: effects of different concentrations of MA on the LDH viability in BRL-3A cells; B: different concentrations of MA inhibit H₂O₂-induced LDH leakage in BRL-3A cells. n=6; **P<0.01 compared with the control group; #P<0.05, ##P<0.01 compared with the model group.

图3 山楂酸对H₂O₂损伤的BRL-3A细胞中LDH渗漏的抑制作用

Fig.3 Inhibitory effects of MA on the leakage of LDH in H₂O₂-injured BRL-3A cells



A: SOD活力; B: CAT活力; C: GSH含量; D: MDA含量。n=3; **P<0.01, 与对照组相比; #P<0.05, ##P<0.01, 与模型组相比。

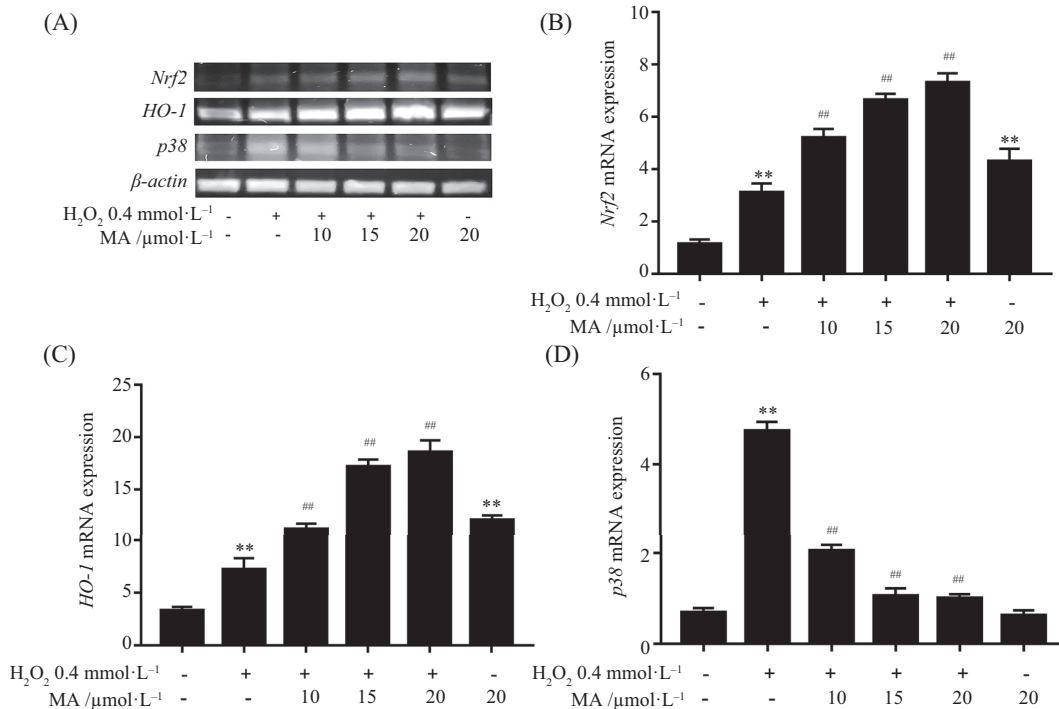
A: SOD activity; B: CAT activity; C: GSH content; D: MDA content. n=3; **P<0.01 compared with the control group; #P<0.05, ##P<0.01 compared with the model group.

图4 山楂酸对H₂O₂诱导BRL-3A细胞中SOD、CAT活力以及GSH、MDA含量的影响

Fig.4 Effects of MA on the activities of SOD and CAT, the contents of GSH and MDA in H₂O₂-induced BRL-3A cells

蛋白表达水平显著降低($P<0.01$), p38蛋白磷酸化水平显著升高($P<0.01$); 山楂酸单独刺激组的HO-1蛋白表达水平显著上升($P<0.05$), 核内Nrf2蛋白表达水平显著升高($P<0.01$), 胞质的Nrf2蛋白表达水平显著下降($P<0.01$), p38蛋白磷酸化水平无显著变

化($P>0.05$)。与模型组相比, 不同浓度的山楂酸干预后, HO-1蛋白和核内Nrf2蛋白表达水平显著提高($P<0.05$), 而胞质Nrf2的表达下降($P<0.05$), 磷酸化p38蛋白表达也显著降低($P<0.05$), 并均呈现一定的剂量依赖性。结果表明, 山楂酸能促进Nrf2入核, 上



A: *Nrf2*、*HO-1*和*p38*的mRNA表达水平; B: *Nrf2*的相对表达; C: *HO-1*的相对表达; D: *p38*的相对表达。β-actin作为内参, n=3; **P<0.01, 与对照组相比; ##P<0.01, 与模型组相比。

A: the mRNA levels of *Nrf2*, *HO-1* and *p38*; B: the relative expression of *Nrf2* to β-actin; C: the relative expression of *HO-1* to β-actin; D: the relative expression of *p38* to β-actin. n=3; **P<0.01 compared with the control group; ##P<0.01 compared with the model group.

图5 山楂酸对BRL-3A细胞中*Nrf2*、*HO-1*和*p38* mRNA表达水平的影响

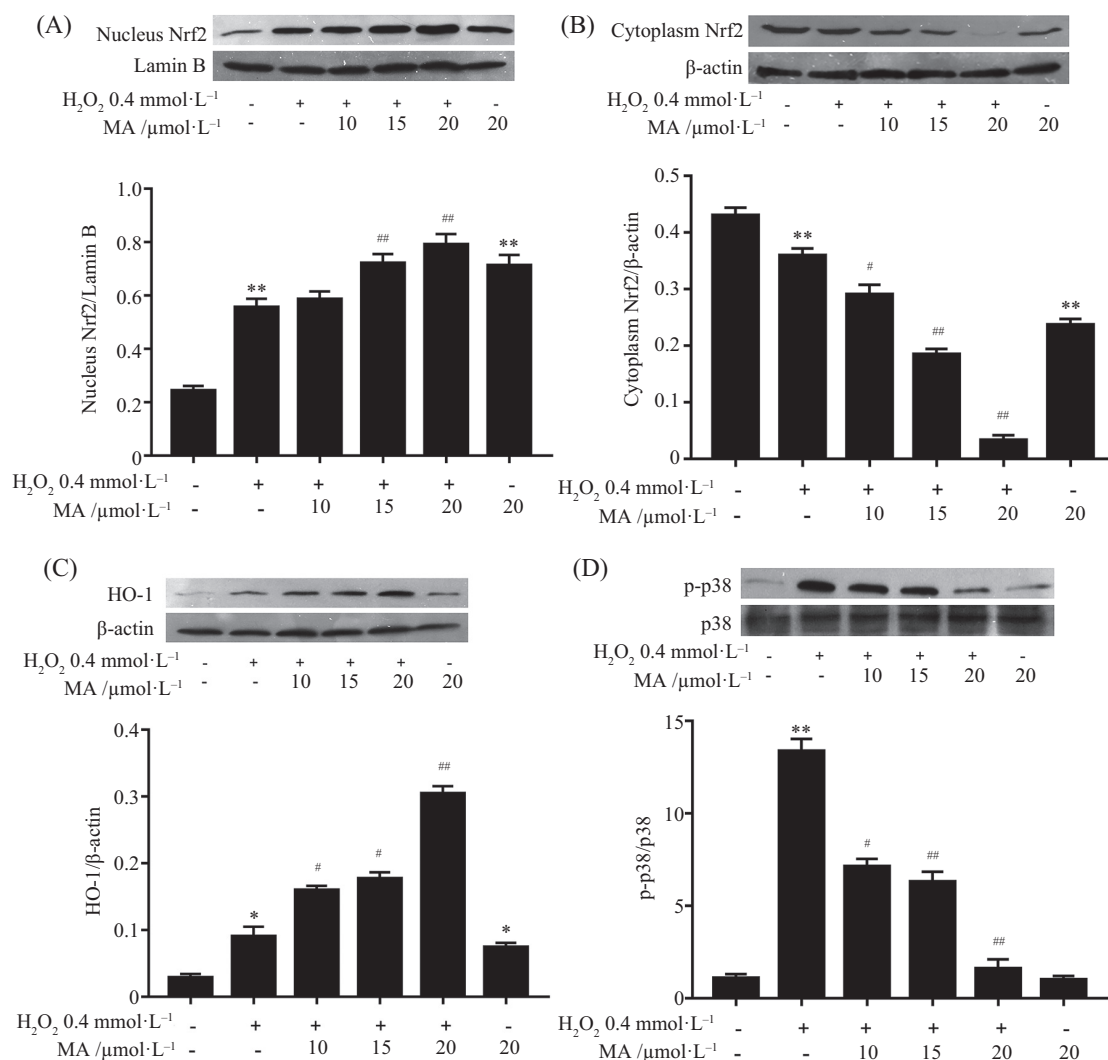
Fig.5 Effects of MA on the mRNA levels of *Nrf2*, *HO-1* and *p38* in BRL-3A cells

调HO-1蛋白的表达,这可能与它抑制p38蛋白的磷酸化水平有关。

3 讨论

研究表明,氧化应激与肝脏疾病的发生发展有重要关系^[3-4,15]。H₂O₂是一种强氧化剂,可以破坏细胞内部的氧化-抗氧化平衡系统,常被用于体外氧化损伤模型的建立。已有研究表明,H₂O₂能引起肝细胞的氧化损伤,在肝脏疾病的发生发展中发挥重要的作用^[16-17]。因此,寻找有效的氧自由基清除剂对氧化应激的损伤防治具有重要意义。近年来,天然活性产物因其在安全性和功效上的优越性受到广泛的关注。山楂酸是一种五环三萜酸,在日常可食用或药用的天然植物中广泛存在^[8,18]。已有研究表明,山楂酸具有较好的抗氧化活性^[9-10,19]。在本实验中,我们采用H₂O₂诱导的BRL-3A肝细胞损伤模型,观察山楂酸预防性干预对氧化损伤肝细胞的效应,进一步阐明山楂酸的肝保护作用机制,为山楂酸作为一种潜在的自由基清除剂和天然抗氧化剂的新资源加以研究和开发提供理论依据。

本实验发现,BRL-3A细胞经H₂O₂诱导后,细胞活力显著下降,而细胞培养液中的LDH活力显著升高,这表明H₂O₂对BRL-3A肝细胞具有明显的损伤作用,H₂O₂使细胞膜结构受损,细胞膜通透性增加,从而使LDH渗漏增加。不同剂量的山楂酸预孵可以增加细胞活力,减少LDH渗漏,对损伤的肝细胞有一定的保护作用。此外,利用MTT法研究山楂酸单独作用对BRL-3A细胞活性的影响,结果显示,山楂酸在剂量达30 μmol/L时,对BRL-3A细胞活性仍无显著影响(图1A),说明山楂酸在5~30 μmol/L的选定剂量范围内对BRL-3A细胞无明显毒性。进一步的研究结果发现,经H₂O₂损伤后BRL-3A细胞中的ROS和MDA水平显著增加,GSH含量、SOD和CAT活力显著下降,而与H₂O₂模型组相比,山楂酸干预组中上述指标都得到了不同程度的改善。这和相关文献的研究结果一致^[11],山楂酸一方面通过降低胞内的ROS水平,减少由ROS触发的氧化应激造成的脂质过氧化产物MDA水平的增加,另一方面通过提高GSH含量、SOD和CAT活力来抵御氧化应激的损害,对H₂O₂诱导的BRL-3A肝细胞损伤起保护作用。结果



A: 核内Nrf2的蛋白表达情况; B: 胞质Nrf2的蛋白表达情况; C: HO-1的蛋白表达情况; D: p-p38的蛋白表达情况。Lamin B和β-actin作为内参。n=3; *P<0.05, **P<0.01, 与对照组相比; #P<0.05, ##P<0.01, 与模型组相比。

A: the protein expression of nucleus Nrf2; B: the protein expression of cytoplasm Nrf2; C: the protein expression of HO-1; D: the protein expression of p-p38. Lamin B and β-actin served as the loading control. n=3; *P<0.05, **P<0.01 compared with the control group; #P<0.05, ##P<0.01 compared with the model group.

图6 山楂酸对BRL-3A细胞中Nrf2、HO-1和p-p38蛋白表达水平的影响

Fig.6 Effects of MA on the protein levels of Nrf2, HO-1 and p-p38 in BRL-3A cells

表明, 山楂酸可通过影响酶类和非酶类抗氧化物在保护肝细胞免受氧化应激的反应中发挥重要作用。

Nrf2是CNC亮氨酸拉链转录激活因子(cap'n' collar subfamily of basic leucine zipper, CNC-bZIP)家族中活力最强的转录调节因子^[20]。正常生理状态下, Nrf2位于胞质中, 无活性, 在氧化应激状态下, Nrf2被激活与Keap1解离转移入核, 与Maf蛋白形成二聚体后与ARE结合, 调控下游的靶基因抗氧化酶如HO-1基因的表达^[21-22]。既往的研究表明, HO-1在肝脏损伤中发挥重要的抗氧化保护作用^[6-7]。在H₂O₂作用后, 肝细胞内产生大量ROS, Nrf2的核内水平应激性增高,

促使下游靶基因如HO-1的表达, 一定程度上起到自身防御保护的作用^[23-24]。我们的研究结果还发现, 与模型组相比, 山楂酸能激活Nrf2转位入核, 诱导下游靶基因HO-1的mRNA和蛋白的表达水平, 并且其表达水平随着山楂酸剂量的加大而升高。进一步的研究还发现, 山楂酸单独作用能促进Nrf2转位入核, 对HO-1的mRNA和蛋白表达有直接的诱导作用, 进而减轻BRL-3A细胞的氧化应激程度。这些结果与山楂酸能通过促进Nrf2入核, 转录激活HepG2细胞中的HO-1和NQO1的表达一致^[25]。提示, 日常饮食中山楂酸的摄入可以起到一定的保肝作用, 这可能与激

活HO-1保护性蛋白相关。

已有研究表明, 山楂酸能通过抑制MAPK通路减少氧化应激因子和炎症因子的损伤, 缓解酒精诱发的肝毒性^[11]。在本研究中, 10~20 $\mu\text{mol/L}$ 的山楂酸可剂量依赖性抑制由 H_2O_2 引起的BRL-3A肝细胞中p38磷酸化水平的增加。但是, 山楂酸对肝细胞中HO-1蛋白调控的时效和量效关系以及具体的信号机制有待进一步探讨。

综上所述, 山楂酸能有效保护由 H_2O_2 导致的BRL-3A肝细胞氧化损伤, 其保护机制可能与山楂酸能激活Nrf2转位入核, 提高下游靶基因*HO-1*的表达和抑制p38的磷酸化水平相关。由此表明, 山楂酸对肝脏疾病的防治有一定的作用, 山楂酸可以作为天然抗氧化剂的新资源被进一步开发利用, 相关的机制研究还有待进一步的深入。

参考文献 (References)

- [1] SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine [J]. *Redox Biol*, 2015, 4: 180-3.
- [2] RAY G, HUSAIN SA. Oxidants, antioxidants and carcinogenesis [J]. *Indian J Exp Biol*, 2002, 40(11): 1213-32.
- [3] GONZALEZ-SANCHEZE, PEREZ M J, NYTOFTE N S, et al. Protective role of biliverdin against bile acid-induced oxidative stress in liver cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 97: 466-77.
- [4] IMARISIO C, ALCHEA E, BANGALORE REVANNA C, et al. Oxidative and ER stress-dependent ASK1 activation in steatotic hepatocytes and Kupffer cells sensitizes mice fatty liver to ischemia/reperfusion injury [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 112: 141-8.
- [5] MCMAHON M, THOMAS N, ITOH K, et al. Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(34): 24756-68.
- [6] LIU C M, MA J Q, XIE W R, et al. Quercetin protects mouse liver against nickel-induced DNA methylation and inflammation associated with the Nrf2/HO-1 and p38/STAT1/NF- κ B pathway [J]. *Food Chem Toxicol*, 2015, 82: 19-26.
- [7] WANG W, WU L, LI Q, et al. Madecassoside prevents acute liver failure in LPS/D-GalN-induced mice by inhibiting p38/NF- κ B and activating Nrf2/HO-1 signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 1137-45.
- [8] LI C, YANG Z, LI Z, et al. Maslinic acid suppresses osteoclastogenesis and prevents ovariectomy-induced bone loss by regulating RANKL-mediated NF- κ B and MAPK signaling pathways [J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(3): 644-56.
- [9] MÁRQUEZ MARTÍN A, DE LA PUERTA VÁZQUEZ R, FERNÁNDEZ-ARCHE A, et al. Suppressive effect of maslinic acid from pomace olive oil on oxidative stress and cytokine production in stimulated murine macrophages [J]. *Free Radical Res*, 2006, 40(3): 295-302.
- [10] MKHWANAZI B N, SERUMULA M R, MYBURG R B, et al. Antioxidant effects of maslinic acid in livers, hearts and kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats: effects on kidney function [J]. *Ren Fail*, 2014, 36(3): 419-31.
- [11] YAN S L, YANG H T, LEE H L, et al. Protective effects of maslinic acid against alcohol-induced acute liver injury in mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 74: 149-55.
- [12] WANG Y Y, DIAO B Z, ZHONG L H, et al. Maslinic acid protects against lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver injury in mice [J]. *Microb Pathog*, 2018, 119: 49-53.
- [13] LI S, DING Y, NIU Q, et al. Lutein has a protective effect on hepatotoxicity induced by arsenic via Nrf2 signaling [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 315205.
- [14] ZHU L, YI X, ZHAO J, et al. Betulinic acid attenuates dexamethasone-induced oxidative damage through the JNK-P38 MAPK signaling pathway in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 499-508.
- [15] EZHILARASAN D. Oxidative stress is bane in chronic liver diseases: Clinical and experimental perspective [J]. *Arab J Gastroenterol*, 2018, 19(2): 56-64.
- [16] JIN X, YANG Y D, CHEN K, et al. HDMCP uncouples yeast mitochondrial respiration and alleviates steatosis in L02 and hepG2 cells by decreasing ATP and H_2O_2 levels: a novel mechanism for NAFLD [J]. *J Hepato*, 2009, 50(5): 1019-28.
- [17] SHI C, CHEN X, LIU Z, et al. Oleuropein protects L-02 cells against H_2O_2 -induced oxidative stress by increasing SOD1, GPx1 and CAT expression [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85: 740-48.
- [18] BIANCHI G, POZZI N, VLAHOV G. Pentacyclic triterpene acids in olives [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37(37): 205-7.
- [19] MOKHTARI K, RUFINOPALOMARES E E, PÉREZJIMÉNEZ A, et al. Maslinic acid, a triterpene from olive, affects the antioxidant and mitochondrial status of B16F10 melanoma cells grown under stressful conditions [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2015, 2015: 272457.
- [20] YU X, KENSLER T. Nrf2 as a target for cancer chemoprevention [J]. *Mutat Res-Rev Mutat*, 2005, 591(1-2): 93-102.
- [21] MIYAZAKI T, KIRINO Y, TAKENO M, et al. Expression of heme oxygenase-1 in human leukemic cells and its regulation by transcriptional repressor Bach1 [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(6): 1409-16.
- [22] CHEN X L, KUNSCH C. Induction of cytoprotective genes through Nrf2/antioxidant response element pathway: a new therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases [J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(8): 879-91.
- [23] PANG C, ZEHGN Z, SHI L, et al. Caffeic acid prevents acetaminophen-induced liver injury by activating the Keap1-Nrf2 antioxidative defense system [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 91: 236-46.
- [24] LU C, XU W, ZHANG F, et al. Nrf2 knockdown attenuates the ameliorative effects of ligustrazine on hepatic fibrosis by targeting hepatic stellate cell transdifferentiation [J]. *Toxicology*, 2016, 365: 35-47.
- [25] YAP W H, KHOO K S, HO A S H. Maslinic acid induces HO-1 and NOQ1 expression via activation of Nrf2 transcription factor [J]. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 2012, 2(1): 51-8.