

• 论著 •

谷胱甘肽通过 Nrf2/ARE 通路改善四氯化碳诱导大鼠肝损伤和肝纤维化^{*}

梁玉梅¹ 陈维宪² 黄群锋³

(1. 南方医科大学珠江医院药学部, 广东 广州 510260; 2. 广州市番禺区妇幼保健院药剂科, 广东 广州 511400;

3. 广州医科大学附属第五医院肿瘤科, 广东 广州 510700)

【摘要】 目的 探讨谷胱甘肽(GSH)对四氯化碳(CCl₄)诱导的大鼠肝损伤和肝纤维化的疗效和保护机制。**方法** 利用 CCl₄ 处理雄性 SD 大鼠, 分别给予生理盐水和谷胱甘肽治疗。收集大鼠血液以测量生化指标(ALT、AST、ALP)和炎症因子(IL-6、TNF- α 和 IL-1 β), 收集肝脏组织进行组织病理学分析、纤维化标志蛋白、促纤维化信号分子、Nrf2/ARE 通路相关蛋白的表达分析。**结果** 谷胱甘肽改善了 CCl₄ 诱导的肝损伤, 降低了炎症因子的表达。谷胱甘肽还通过减少纤维化标志蛋白和促纤维化信号分子的表达, 以及降低脂质过氧化物和丙二醛的水平和提高谷胱甘肽含量来改善肝脏氧化应激。此外, 谷胱甘肽可以激活 Nrf2/ARE 通路, 提高 Nrf2 下游抗氧化基因的表达, 减轻 CCl₄ 诱导的大鼠肝脏氧化应激。**结论** 谷胱甘肽在体内保护大鼠肝脏免受 CCl₄ 引起的损伤和纤维化, 这与抑制 HSC 活化和减轻氧化应激有关。

【关键词】 谷胱甘肽; Nrf2/ARE 通路; 肝损伤; 肝纤维化

【中图分类号】 R575.2 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2024. 04. 002

Reduced glutathione improves liver injury and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats through Nrf2/ARE pathway

LIANG Yumei¹, CHEN Weixian², HUANG Qunfeng³

(1. Department of Pharmacy, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510260, China;

2. Department of Pharmacy, Panyu Maternal and Child Health Hospital, Guangzhou 511400, China;

3. Department of Oncology, The Fifth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510700, China)

【Abstract】 Objective The aim of this study was to investigate the effect and protective mechanism of reduced glutathione on liver injury and fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in rats. **Methods** Male Sprague-Dawley (SD) rats were treated with CCl₄ and given normal saline and protoglutathione respectively. Biochemical indexes (ALT, AST, ALP) and inflammatory factors (IL-6, TNF- α , and IL-1 β) were measured in the blood of rats. Histopathological analysis, expression of fibrosis marker proteins, pro-fibrosis signaling molecules, and Nrf2/ARE pathway related proteins were performed in liver tissues. **Results** Glutathione improved CCL₄-induced liver injury and decreased the expression of inflammatory factors. Glutathione also ameliorates hepatic oxidative stress by reducing the expression of fibrotic marker proteins and pro-fibrotic signaling molecules, as well as reducing lipid peroxides and malondialdehyde levels and increasing glutathione content. In addition, glutathione can activate the Nrf2/ARE pathway, increase the expression of Nrf2 downstream antioxidant genes, and alleviate CCL₄-induced oxidative stress in rat liver. **Conclusion** Glutathione in vivo protects the rat liver from CCL₄-induced damage and fibrosis, which is associated with inhibiting HSC activation and alleviating oxidative stress.

【Key words】 Glutathione; Nrf2/ARE pathway; Liver injury; Liver fibrosis

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目(A201910356)

引用本文: 梁玉梅, 陈维宪, 黄群锋. 谷胱甘肽通过 Nrf2/ARE 通路改善四氯化碳诱导大鼠肝损伤和肝纤维化[J]. 西部医学, 2024, 36(4): 473-479, 488. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2024. 04. 002

肝纤维化是肝脏在受到外界刺激后发生的自我修复和伤口愈合,导致肝脏中细胞外基质的过度产生和沉积^[1-2]。肝纤维化病程迁延而可逆,若无积极有效干预措施可进展为肝硬化,进而引发肝衰竭、肝性脑病、胃食管静脉曲张破裂出血等一系列严重并发症,给患者造成极大痛苦和死亡风险,同时也给社会带来了巨大经济负担。因此,肝纤维化的早期诊断和有效干预尤为重要,其确诊有赖于肝纤维化分子基础的研究。相关的临床和实验研究表明,肝损伤消除后可能会出现纤维化消退^[3-4]。肝星状细胞(Hepatic stellate cell, HSCs)的活化是肝纤维化发病机制中的关键环节,激活过程的特征是表型从静止的富含维生素 A 的表型转变为肌成纤维细胞的纤维化表型^[5]。

许多具有抗氧化作用的人工和天然制剂已被建议用于治疗 and 预防过度氧化应激引起的肝病^[6]。因此,补充抗氧化剂对人体健康有益。谷胱甘肽(Glutathione, GSH)是一种内源性三肽,肝脏是其含量最高的组织之一。补充内源性谷胱甘肽的有效方法是使用 S-酰基前药,如 S-乙酰基-谷胱甘肽(S-acetyl-glutathione, SAG),其能够穿过细胞膜并增加细胞内 SH 基团^[7]。与直接进入细胞的 GSH 不同, SAG 在血浆中更稳定,一旦进入细胞质,就会被细胞质硫酯酶转化为 GSH。特别是,硫原子的乙酰化避免了谷胱甘肽的分解,并简化了其通过肠壁的吸收^[8]。四氯化碳(Carbon tetrachloride, CCl₄)诱导的肝损伤被广泛用于人类肝脏疾病的实验模型和鉴定潜在的肝保护剂。目前已经证实,靶向 Nrf2-ARE 信号通路可以保护肝脏免受 CCl₄ 诱导的损伤^[9]。据报道,海地瓜中的胶原蛋白肽通过 Keap1/Nrf2-ARE、PI3K/AKT 和 MAPKs 途径预防 CCl₄ 诱导的肝损伤^[10]。红松松仁多糖 PNP40c-1 通过 NRF2/ARE/MKP1/JNK 信号通路对 CCl₄ 诱导的小鼠肝损伤发挥肝脏保护作用^[11]。基于这些研究,我们猜想谷胱甘肽通过 Nrf2/ARE 通路改善 CCl₄ 诱导大鼠肝损伤和肝纤维化。本研究建立了 CCl₄ 诱导的大鼠肝损伤和纤维化的假设来验证谷胱甘肽对肝损伤、胶原蛋白产生、HSC 活化和体内氧化应激的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 CCl₄、GSH 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司(中国), qRT-PCR 引物购自北京擎科生物科技股份有限公司(中国), ALT、AST、ALP、羟脯氨酸测定试剂盒、LPO、MDA、GSH 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所, IL-6、TNF- α 和 IL-1 β ELISA 测定试剂盒购自美国 Millipore 公司, 一抗 anti- α -SMA、anti- α 1(I) procollagen、anti-fibronectin、an-

ti-TGF- β R1、anti-PDGF- β R、anti-EGFR、anti-Nrf2、anti-ARE 和 anti- β -actin 购自 Abcam 公司, 细胞色素 P450 2E1(CYP2E1)活性检测试剂盒购自上海臻科生物科技有限公司。

1.2 动物模型构建 雄性 SD 大鼠(体重 180~220 g)购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。参考前述研究进行^[12], 用 CCl₄(0.1 mL/100 g 体重)和橄榄油[1:1(w/v)]的混合物诱导大鼠肝损伤。将 32 只大鼠按照配对比较法随机分为 4 组, 每组 8 只。第 1 组为对照组, 大鼠腹腔注射橄榄油, 未注射 CCl₄ 或 GSH。第 2 组为 CCl₄ 组, 大鼠腹腔注射 CCl₄, 未经 GSH 处理。第 3 组为低剂量治疗组, 大鼠静脉注射 CCl₄, 并灌胃 50 mg/kg GSH。第 4 组为高剂量治疗组, 大鼠静脉注射 CCl₄, 并灌胃 100 mg/kg GSH。第 2 至 4 组大鼠每隔一天腹腔注射 CCl₄, 持续 8 周。将 GSH 溶于橄榄油中, 在第 5 至 8 周每天灌胃一次。实验结束时, 大鼠经腹腔注射戊巴比妥(50 mg/kg)麻醉后处死。采集血液, 分离肝脏并称重。实验期间, 所有大鼠生长良好, 未出现死亡。本研究经我院伦理委员会审核批准(批准号: AEW-2201061)。

1.3 肝组织病理学分析 参考前述进行苏木精-伊红(HE)染色和天狼星红染色^[13], 分析肝组织切片的病理变化。

1.4 肝细胞色素 P450 2E1(CYP2E1)活性的测定 将 0.1 mL 样品添加到含有 70 mM Tris-HCl(pH 7.4)、10.0 mM 氨基脲、14 mM MgCl₂、215 mM KCl 和 4 mM NADPH 的混合物中, 最终体积为 1.0 mL。在 37 °C 下孵育混合物 30 min, 之后通过添加 1.5 mL 12.5% 三氯乙酸来终止反应。在 2000 rpm 离心 1.5 min 后, 将 2 mL 上清液与 1.0 mL 含有 6 M 乙酸铵、60 mM 乙酰丙酮和 0.15 M 乙酸的 NASH 试剂混合。然后将试管在 70 °C 下孵育 20 min, 并在 415 nm 处测量形成的六氯环己烷。CYP2E1 活性以每分钟每毫克蛋白质的纳摩尔数表示。

1.5 ELISA 检测相关指标水平 收集大鼠的血清样本, 使用 ELISA 试剂盒检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)的水平; 用 ELISA 试剂盒检测 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平。

1.6 肝组织羟脯氨酸的测定 将从每只大鼠肝脏随机切下的三小块肝组织在 110 °C 的 6N HCl 中水解 24 h, 随后用 NaOH 中和。在水解产物的等分试样中加入柠檬酸盐缓冲氯胺 T 中的异丙醇, 然后加入 Ehrlich 试剂。在 60 °C 的避光条件下孵育 25 min。离心后, 使用 96 孔板光谱仪在 558 nm 处读取每个样品的

上清液的吸光度。

1.7 qRT-PCR 检测基因表达水平 通过 Trizol 法进行总 RNA 提取, PrimeScript RT Reagent Kit (Takara, Japan) 用于 cDNA 合成, 随后使用 SYBR Green PCR Kit (Takara, Japan) 进行 qRT-PCR 分析检测基因表达, β -actin 分别作为检测目的基因表达量的内参, 引物序列见表 1。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of qRT-PCR

基因	方向(5'→3')
α -SMA	F: CCGACCGAATGCAGAAGGA R: ACAGAGTATTTGCGCTCCGGA
$\alpha 1(I)$ procollagen	F: CCTCAAGGGCTCCAACGAG R: TCAATCACTGTCTTGCCCCA
fibronectin	F: TGTCACCCACCACCTTGA R: CTGATTGTTCTTCAGTGCGA
TGF- β R1	F: ATCCATGAAGACTATCAGTTGCCT R: CCATTTTGATGCCTTCCTGTTGGCT
PDGF- β R	F: CTGCCACAGCATGATGAGGATTGAT R: GCCAGGATGGCTGAGATCACCAC
EGFR	F: TGCACCATCGACGTCTACAT R: AACTTTGGGCGGCTATCAG
HO-1	F: CGTGCAGAGAATTCTGAGTTC R: AGACGCTTTACGTAGTGCTG
NQO1	F: GCGTCTGGAGACTGTCTGG R: CGGCTGGAATGGACTTGC
GST	F: CGGTACTTGCTGCCTTTG R: ATTTGTTTTGCATCCACGGG
GCLc	F: CTCGCTATGTGGTATTTG R: TTGCTGTAGTCAGGATGG
β -actin	F: GGACTTCGAGCAAGAGATGG R: AGGAAGGAAGGCTGGAAGA

1.8 Western blot 检测蛋白表达水平 肝脏样品在含有蛋白酶抑制剂的放射免疫沉淀分析(RIPA)缓冲液中匀浆。使用 BCA 检测试剂盒(Pierce, USA)测定蛋白水平, 蛋白质通过十二烷基硫酸钠(SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离, 转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(Millipore, USA)上, 用含 0.1% 吐温 20 的 Tris 缓冲盐水的 5% 脱脂奶粉封闭。通过相应的一级抗体和随后的辣根过氧化物酶偶联的二级抗体检测目标蛋白。使用化学发光试剂(Millipore, USA)对蛋白质条带进行可视化。

1.9 检测脂质过氧化(LPO)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽(GSH)的水平 使用 LPO、MDA 和 GSH 检测试剂盒分别测定肝脏组织中 LPO、MDA 和 GSH 水平。

1.10 统计学分析 使用 GraphPad Prism 8.0 进行统计学分析, 计量资料均符合正态分布以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 多组间差异使用 Anova 检验, 两组间差异的比较使用 Student t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计

学意义。

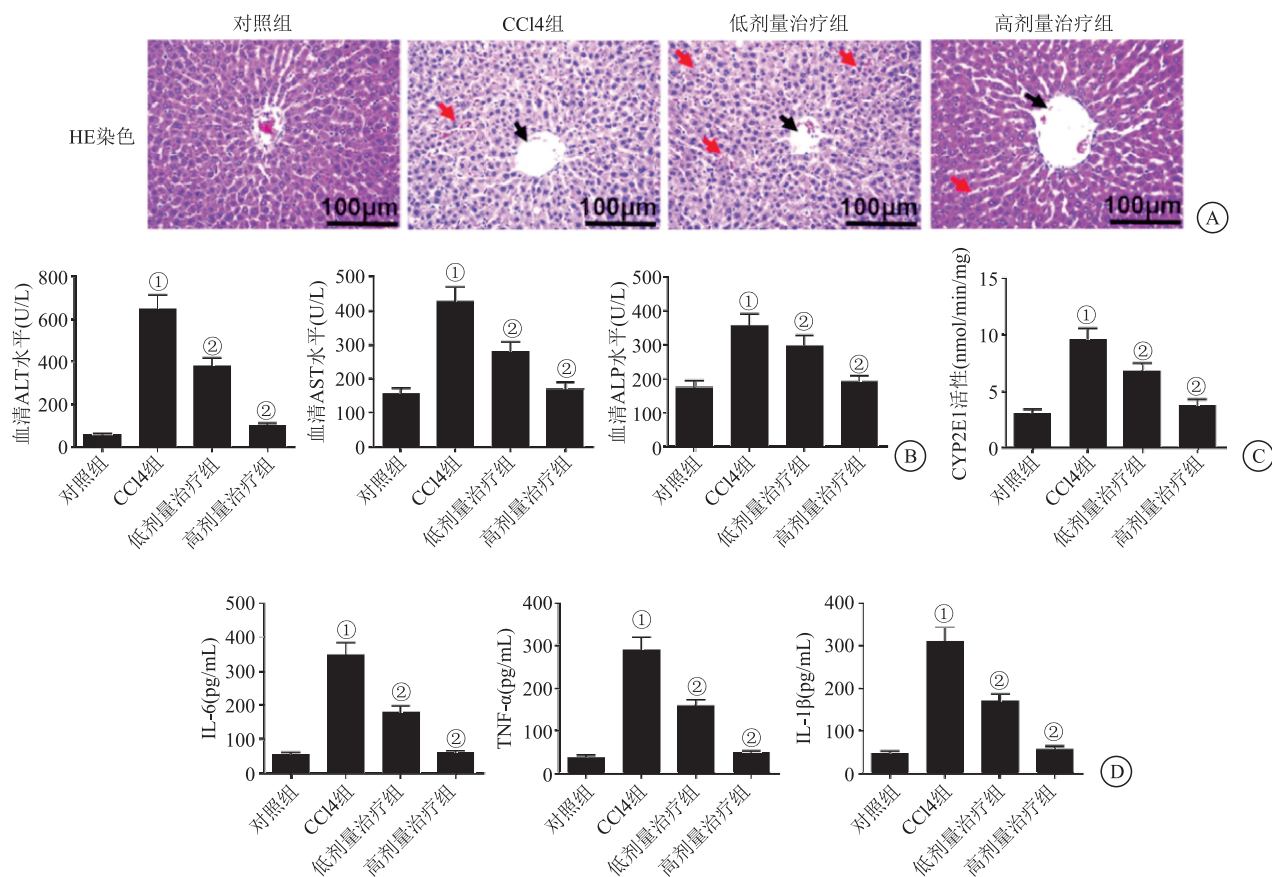
2 结果

2.1 谷胱甘肽保护大鼠肝脏免受 CCl₄ 诱导的损伤 HE 染色结果显示, CCl₄ 治疗诱导了严重的肝损伤, 表现为弥漫性小叶中心坏死伴全小叶炎症, 而谷胱甘肽预处理减轻了 CCl₄ 诱导的坏死和炎症细胞浸润, 见图 1A; 在 CCl₄ 治疗的大鼠血清中 ALT、AST 和 ALP 水平显著升高, 谷胱甘肽剂量依赖性地降低了血清 ALT、AST 和 ALP 水平, 并且高剂量的谷胱甘肽在降低血清 ALT、ALT 和 ALP 水平方面更为显著($P < 0.05$), 见图 1B; CCl₄ 处理后, 大鼠肝脏 CYP2E1 活性被激活, 而谷胱甘肽显著降低 CYP2E1 的活性($P < 0.05$), 见图 1C; CCl₄ 导致大鼠血清中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的显著增加, 而谷胱甘肽治疗显著逆转了这一结果($P < 0.05$), 见图 1D。综上提示, 谷胱甘肽可以改善 CCl₄ 注射引起的肝损伤。

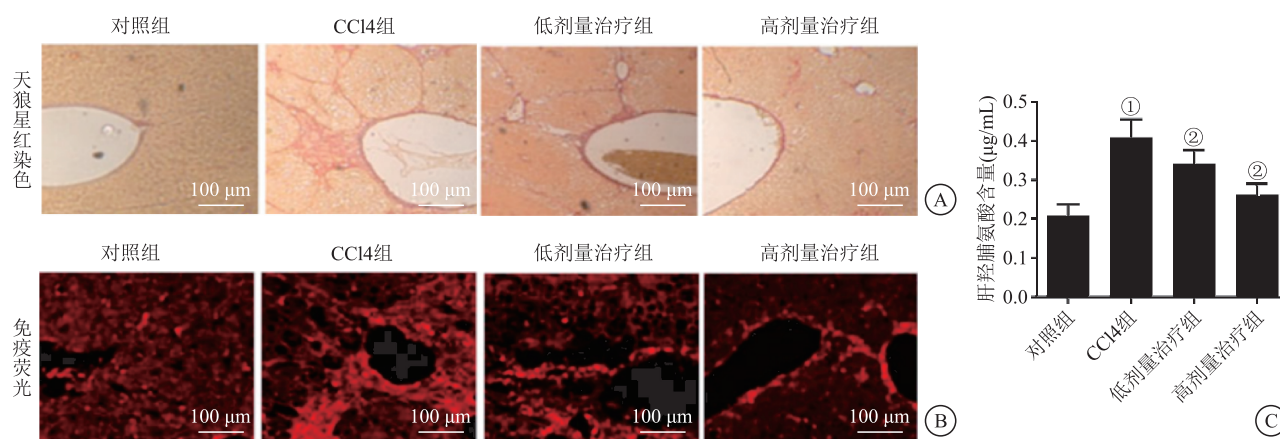
2.2 谷胱甘肽可以降低 CCl₄ 诱导的大鼠肝脏中胶原蛋白表达 天狼星红染色检测大鼠肝脏中胶原蛋白的表达结果显示, 在 CCl₄ 诱导的大鼠肝脏中胶原蛋白严重沉积, 并伴有结节形成, 谷胱甘肽可以逆转这一影响(图 2A); $\alpha 1(I)$ 型前胶原($\alpha 1(I)$ procollagen)的免疫荧光染色显示类似的结果(图 2B), 表明谷胱甘肽减少了纤维化肝脏中的 $\alpha 1(I)$ 型前胶原表达。肝羟脯氨酸的测定结果显示, 谷胱甘肽以剂量依赖显著降低了纤维化肝脏中羟脯氨酸的含量(图 2C), 表明纤维化肝脏中胶原蛋白的积累减少($P < 0.05$)。综上提示, 谷胱甘肽可以通过抑制大鼠胶原的表达来减弱 CCl₄ 诱导的肝纤维化。

2.3 谷胱甘肽抑制 CCl₄ 引起的大鼠纤维化肝脏中 HSC 的活化 qRT-PCR 和 Western blot 结果显示, α -SMA、 $\alpha 1(I)$ procollagen、fibronectin、TGF- β R1、PDGF- β R 和 EGFR 在 mRNA 和蛋白水平上的表达显著增加, 表明纤维化肝脏中 HSC 过度活化。然而, 谷胱甘肽治疗以剂量依赖性地降低了这些标记物的 mRNA 和蛋白表达($P < 0.05$), 见图 3。综上提示, 谷胱甘肽抑制了 CCl₄ 引起的大鼠纤维化肝脏中 HSC 的激活。

2.4 谷胱甘肽减轻 CCl₄ 引起的大鼠纤维化肝脏氧化应激 为了评估谷胱甘肽对体内氧化应激的影响, 我们测定了肝组织匀浆中 LPO 和 MDA 的水平。CCl₄ 的处理显著增加了大鼠肝脏 LPO 和 MDA 的水平, 但谷胱甘肽的治疗以剂量依赖的方式降低了 LPO 和 MDA 的水平($P < 0.05$), 见图 4A、B; 我们的结果发现 CCl₄ 处理的大鼠肝脏 GSH 水平显著降低, 但是通过谷胱甘肽处理以剂量依赖的方式得到改善($P <$

图 1 谷胱甘肽保护大鼠肝脏免受 CCl₄ 诱导的损伤Figure 1 Reduced glutathione protects rat liver from CCl₄-induced damage

注: A. 肝脏组织 HE 染色结果, 红色箭头指向炎症浸润, 黑色箭头指向炎症白点; B. ALT、AST 和 ALP 的水平; C. CYP2E1 活性; D. IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的水平; 与对照组比较, ① $P < 0.05$; 与 CCl₄ 组比较, ② $P < 0.05$ 。

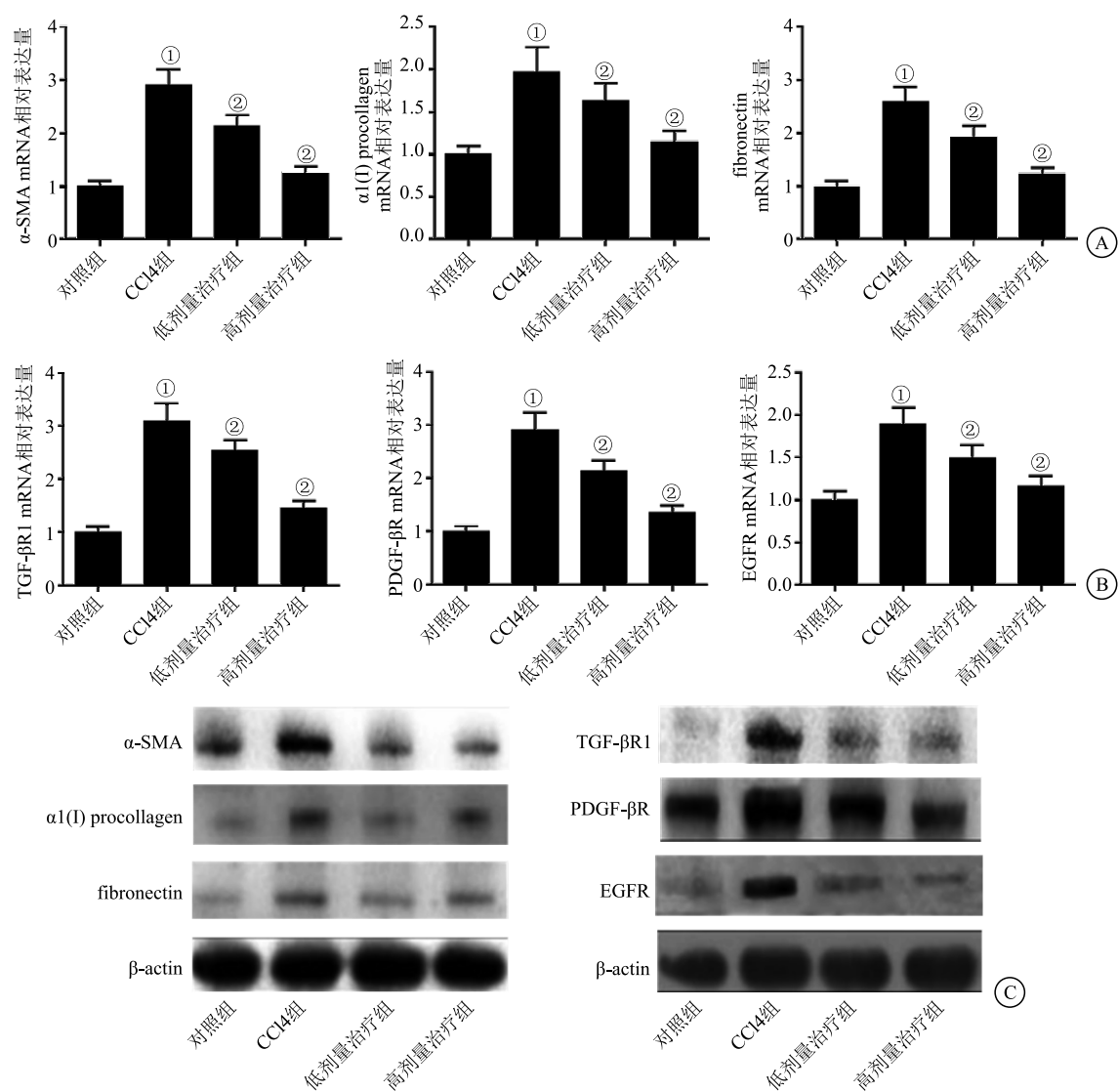
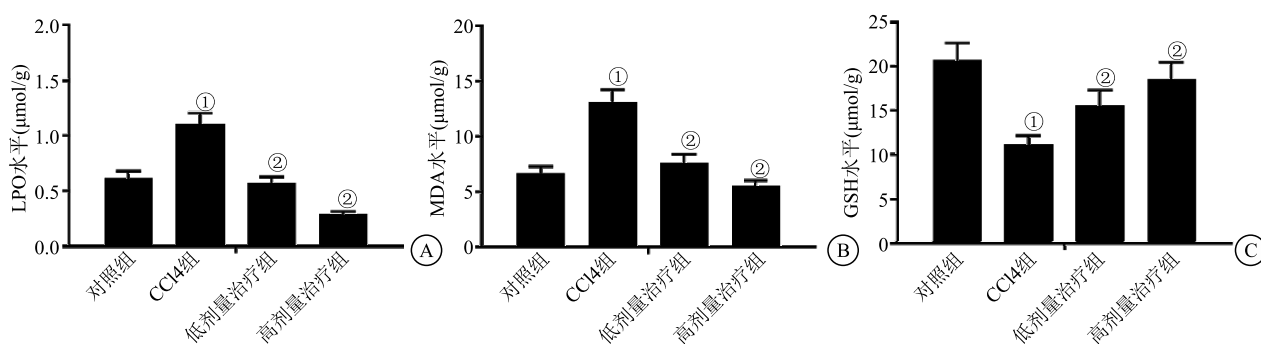
图 2 谷胱甘肽可以降低 CCl₄ 诱导的大鼠肝脏中胶原蛋白表达Figure 2 Reduced glutathione can reduce collagen expression in CCl₄-induced rat liver

注: A. 天狼星红染色; B. 免疫荧光染色; C. 肝羟脯氨酸水平; 与对照组比较, ① $P < 0.05$; 与 CCl₄ 组比较, ② $P < 0.05$ 。

0.05), 见图 4C。提示谷胱甘肽减轻了 CCl₄ 给药引起的大鼠纤维化肝脏的氧化应激。

2.5 谷胱甘肽促进 Nrf2/ARE 通路的活性 为了研究 Nrf2/ARE 信号通路是否参与谷胱甘肽对 CCl₄ 诱导的肝损伤的保护作用, 我们检测了 Nrf2 和 ARE 在

CCl₄ 诱导大鼠肝组织中的表达。结果表明, CCl₄ 处理显著降低了 Nrf2 和 ARE 的表达, 而谷胱甘肽显著提高 Nrf2 和 ARE 的表达(图 5A), 以上结果提示 Nrf2/ARE 信号通路可能参与了谷胱甘肽对 CCl₄ 诱导的肝损伤的保护作用。为了进一步证实谷胱甘肽

图 3 谷胱甘肽抑制 CCl₄ 引起的大鼠纤维化肝脏中 HSC 的活化Figure 3 Reduced glutathione inhibits HSC activation in CCl₄-induced rat fibrotic liver注:与对照组比较,① $P < 0.05$;与 CCl₄ 组比较,② $P < 0.05$ 。图 4 谷胱甘肽减轻 CCl₄ 引起的大鼠纤维化肝脏氧化应激Figure 4 Reduced glutathione alleviates CCl₄ induced oxidative stress in rat fibrotic liver注:与对照组相比,① $P < 0.05$;与 CCl₄ 组相比,② $P < 0.05$ 。

对 CCl₄ 诱导大鼠肝组织 Nrf2/ARE 信号通路的影响,我们检测了 Nrf2 下游抗氧化基因的表达。结果

显示,CCl₄ 处理后降低的 GST、GCLc、NQO1 和 HO-1 的表达,而在谷胱甘肽处理后明显逆转这一结果($P < 0.05$)。

0.05), 见图 5B~E, 进一步验证了谷胱甘肽可以改善

CCl₄ 诱导的大鼠纤维化肝脏氧化应激。

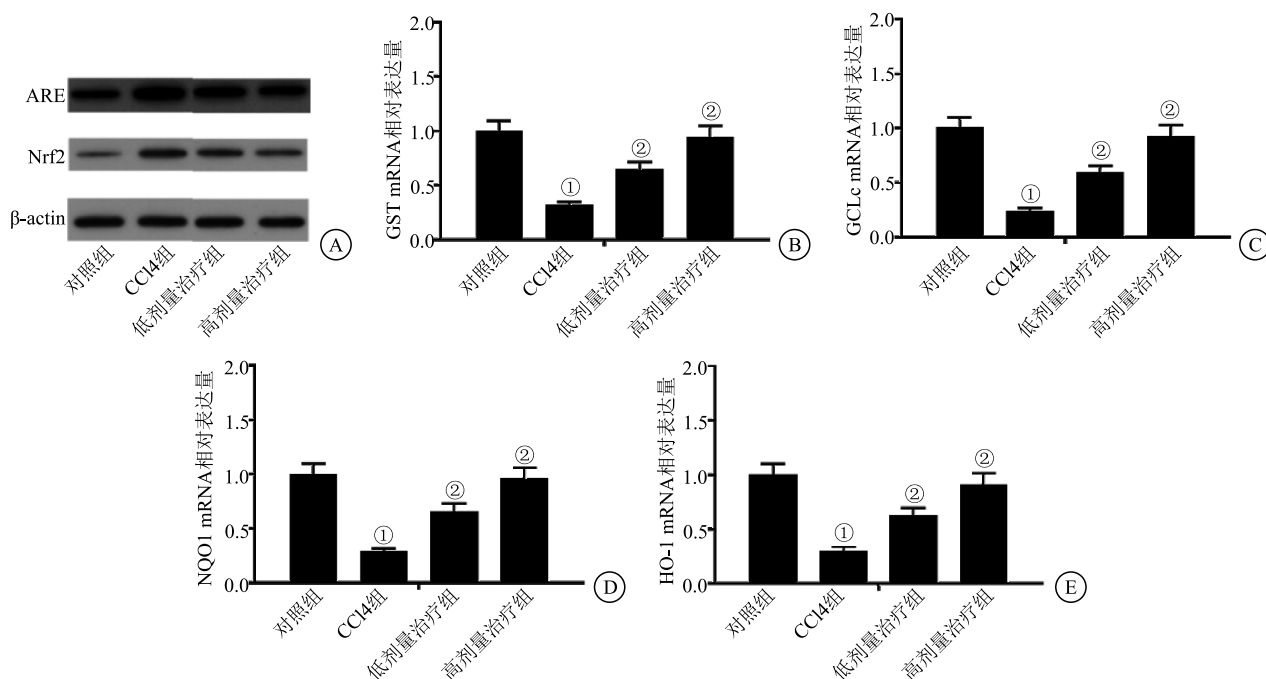


图 5 谷胱甘肽促进 Nrf2/ARE 通路的活性

Figure 5 Reduced glutathione promotes Nrf2/ARE pathway activity

注: A. Nrf2 和 ARE 蛋白表达; B~E 分别为 GST、GCLc、NQO1 和 HO-1 mRNA 表达; 与对照组比较, ① $P < 0.05$; 与 CCl₄ 组比较, ② $P < 0.05$ 。

3 讨论

CCl₄ 诱导肝损伤模型已被广泛应用于肝脏病理研究, 其形态学和生化特征与人类肝脏疾病细胞病变相似^[14]。CCl₄ 处理后大鼠肝脏细胞色素 P450 被激活, 然后产生三氯甲基自由基, 与细胞大分子共价偶联, 从而影响细胞功能; 产生的 CCl₃ 攻击肝细胞膜上的磷脂分子, 引起脂质过氧化反应, 并破坏肝细胞膜结构和功能的完整性。与此同时, 肝组织中 SOD、MDA 和其他相关脂质过氧化指数的水平发生改变, 最终导致肝功能受损^[15]。刺激肝细胞向血液中释放各种酶, 包括 ALT、AST 和 ALP, 这是肝细胞损伤的标志物^[16]。除了上述反应外, CCl₄ 还会引起体内炎症, 导致血液中的炎症细胞因子 (IL-6 和 TNF- α) 和肝组织中的炎症细胞因子 (COX-2 和 PGE2) 发生变化^[17]。在代谢组学方面, CCl₄ 被人体吸收后, 细胞色素 P450 水平升高, 导致一系列脂质过氧化反应, 造成三羧酸循环紊乱, 其他相关途径也受到影响^[18]。本文研究了谷胱甘肽对 CCl₄ 诱导的肝损伤大鼠肝组织病理变化和肝脏指标的影响。结果表明, 谷胱甘肽可以降低大鼠血液中的 ALT、AST、ALP、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平。

HSC 活化是肝纤维化过程中的关键步骤, 因为活化的 HSC 是胶原和其他细胞外基质成分的主要来源。HSC 活化的过程伴随着一系列标志蛋白的上调

表达^[19]。活化 HSC 的减少可能导致胶原的产生和沉积减少; 另一方面, HSC 的激活是由各种细胞因子和趋化因子触发的, 包括 TGF- β 、PDGF 和 EGF, 从枯否氏细胞、窦内皮细胞和活化的 HSC 自身释放^[20]。HSC 的激活过程与相应受体的上调有关, 包括 TGF- β R1、PDGF- β R 和 EGFR。本研究结果显示, 谷胱甘肽抑制了 CCl₄ 大鼠模型中促纤维化受体的表达, 表明谷胱甘肽可以阻断 TGF- β 、PDGF 和 EGF 通路, 从而抑制体内 HSC 的激活。此外, 许多研究表明, HSC 中的胶原表达受到这些促纤维化级联的转录调节^[21-23]。因此, 可以推测谷胱甘肽减少胶原生成可能是这些级联的中断所致, 有助于抗纤维化的功效。

越来越多的研究表明, 氧化应激与不同病因的肝纤维化有关。CCl₄ 在肝脏中的代谢导致脂质过氧化和 ROS 的产生, ROS 可以引发氧化应激过程^[24]。在本研究中, 我们证实了 CCl₄ 损伤肝脏的氧化应激增强, 表现为 LPO 和 MDA 水平显著升高。然而, 谷胱甘肽显著消除了大鼠肝脏中 LPO 和 MDA 水平的增加, 表明氧化应激减弱。此外, 氧化应激可能代表 HSC 活化的直接或间接促纤维化刺激^[25-26]。氧化应激的现象伴随或先于 HSC 活化和胶原沉积。有证据表明, 培养的人或大鼠 HSC 暴露于促氧化系统或经历氧化应激的肝细胞释放的产物的培养基后, I 型前胶原基因的表达和合成增加^[27]。此外, 谷胱甘肽是最

丰富的非酶抗氧化剂,在氧化还原系统中发挥着重要作用。本研究发现谷胱甘肽有效地逆转了纤维化肝脏中 GSH 含量的减少,表明 GSH 的恢复可能是谷胱甘肽抗纤维化作用的重要机制之一。

先前研究报道 Nrf2/ARE 通路参与 CCl₄ 诱导的肝损伤^[28]。据报道,鲑鱼精子 DNA 通过 Nrf2/ARE 和线粒体凋亡途径预防 CCl₄ 诱导的小鼠急性肝损伤^[9]。Han 等^[29]发现黄连素通过调节 Nrf2-Keap1-ARE 和 p53 信号通路改善 CCl₄ 诱导的大鼠肝损伤。另一项研究报道熊果酸通过 Nrf2/ARE 通路改善 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化^[30-32]。本研究的结果显示 CCl₄ 诱导的大鼠肝脏中 Nrf2 和 ARE 的表达受到抑制,而谷胱甘肽可以恢复 Nrf2/ARE 通路活性,揭示谷胱甘肽可能通过激活 Nrf2/ARE 通路改善 CCl₄ 诱导的大鼠肝损伤和肝纤维化。

4 结论

谷胱甘肽在体内保护大鼠肝脏免受 CCl₄ 引起的损伤和纤维化,这些作用可能与抑制 HSC 活化和减轻肝脏氧化应激有关;此外,其还可能通过激活 Nrf2/ARE 通路改善 CCl₄ 诱导的大鼠肝损伤和肝纤维化。

【参考文献】

- [1] FRIEDMAN S L, PINZANI M. Hepatic fibrosis 2022: Unmet needs and a blueprint for the future[J]. *Hepatology*, 2022, 75 (2):473-488.
- [2] CALIGIURI A, GENTILINI A, PASTORE M, *et al.* Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Liver Fibrosis Regression[J]. *Cells*, 2021, 10(10):2759.
- [3] ELLIS E L, MANN D A. Clinical evidence for the regression of liver fibrosis[J]. *J Hepatol*, 2012, 56(5):1171-1180.
- [4] AN P, WEI LL, ZHAO S, *et al.* Hepatocyte mitochondria-derived danger signals directly activate hepatic stellate cells and drive progression of liver fibrosis[J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1):2362.
- [5] GAO J, WEI B, DE ASSUNCAO T M, *et al.* Hepatic stellate cell autophagy inhibits extracellular vesicle release to attenuate liver fibrosis[J]. *J Hepatol*, 2020, 73(5):1144-1154.
- [6] AGHEMO A, ALEKSEEVA OP, ANGELICO F, *et al.* Role of silymarin as antioxidant in clinical management of chronic liver diseases: a narrative review[J]. *Ann Med*, 2022, 54(1): 1548-1560.
- [7] VOGEL J U, CINATL J, DAULETBAEV N, *et al.* Effects of S-acetylglutathione in cell and animal model of herpes simplex virus type 1 infection[J]. *Med Microbiol Immunol*, 2005, 194(1-2):55-59.
- [8] Academy Quality Management Committee. Academy of Nutrition and Dietetics: Revised 2017 Scope of Practice for the Nutrition and Dietetics Technician, Registered[J]. *J Acad Nutr Diet*, 2018, 118(2):327-342.
- [9] HUANG X, CHU X, TIAN Y, *et al.* Preventive effect of salmon sperm DNA on acute carbon tetrachloride-induced liver injury in mice through Nrf2/ARE and mitochondrial apoptosis pathway[J]. *Food Sci Nutr*, 2023, 11(2):733-742.
- [10] LI J, LI Y, LIN S, *et al.* Collagen peptides from *Acaudina molpadioides* prevent CCl₄-induced liver injury via Keap1/Nrf2-ARE, PI3K/AKT, and MAPKs pathways[J]. *J Food Sci*, 2022, 87(5):2185-2196.
- [11] QU H, LIU S, CHENG C, *et al.* Hepatoprotection of pine nut polysaccharide via NRF2/ARE/MKP1/JNK signaling pathways against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice[J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 142:111490.
- [12] ZHANG L, LIU C, YIN L, *et al.* Mangiferin relieves CCl₄-induced liver fibrosis in mice[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1):4172.
- [13] FU Y, ZHENG S, LIN J, *et al.* Curcumin protects the rat liver from CCl₄-caused injury and fibrogenesis by attenuating oxidative stress and suppressing inflammation[J]. *Mol Pharmacol*, 2008, 73(2):399-409.
- [14] POPOV Y, SCHUPPAN D. Targeting liver fibrosis: strategies for development and validation of antifibrotic therapies[J]. *Hepatology*, 2009, 50(4):1294-3106.
- [15] LIU Y, WEN P H, ZHANG X X, *et al.* Breviscapine ameliorates CCl₄-induced liver injury in mice through inhibiting inflammatory apoptotic response and ROS generation[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(2):755-768.
- [16] ELSADEK A E, FATHYBARSEEM N, SULIMAN H A, *et al.* Hepatic Injury in Neonates with Perinatal Asphyxia[J]. *Glob Pediatr Health*, 2021, 8:2333794X20987781.
- [17] DI PAOLA R, MODAFFERI S, SIRACUSA R, *et al.* S-Acetyl-Glutathione Attenuates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury by Modulating Oxidative Imbalance and Inflammation[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(8):4429.
- [18] LIN S, WANG T Y, XU H R, *et al.* A systemic combined nontargeted and targeted LC-MS based metabolomic strategy of plasma and liver on pathology exploration of alpha-naphthylisothiocyanate induced cholestatic liver injury in mice[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 171:180-192.
- [19] YUAN S, WEI C, LIU G, *et al.* Sorafenib attenuates liver fibrosis by triggering hepatic stellate cell ferroptosis via HIF-1alpha/SLC7A11 pathway [J]. *Cell Prolif*, 2022, 55 (1): e13158.
- [20] FRIEDMAN S L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver[J]. *Physiol Rev*, 2008, 88 (1):125-172.
- [21] XIANG D, ZOU J, ZHU X, *et al.* Physalin D attenuates hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by blocking TGF-beta/Smad and YAP signaling[J]. *Phytomedicine*, 2020, 78: 153294.
- [22] QIN R, HUANG W, HUANG Y, *et al.* lncRNA MEG3 modulates hepatic stellate cell activation by sponging miR-145 to regulate PPARgamma[J]. *Mol Med Rep*, 2022, 25(1):3.

- derlying beta cell survival in metabolic stress[J]. *Bioinformatics*, 2013,9(1):37-41.
- [14] NIKKEL S M, AHMED A, SMITH A, *et al.* Mother-to-daughter transmission of Kenny-Caffey syndrome associated with the recurrent, dominant FAM111A mutation p. Arg569His[J]. *Clin Genet*, 2014,86(4):394-395.
- [15] ISOJIMA T, KITANAKA S. Kenny-Caffey syndrome and its related syndromes[J]. *Nihon Rinsho*, 2015,73(11):1959-1964.
- [16] ALABERT C, BUKOWSKI-WILLS J C, LEE S B, *et al.* Nascent chromatin capture proteomics determines chromatin dynamics during DNA replication and identifies unknown fork components[J]. *Nat Cell Biol*, 2014,16(3):281-293.
- [17] WILSON J M, PROKOP J W, LORIMER E, *et al.* Differences in the Phosphorylation-Dependent Regulation of Prenylation of Rap1A and Rap1B[J]. *J Mol Biol*, 2016,428(24 Pt B):4929-4945.
- [18] CHRZANOWSKA-WODNICKA M, KRAUS A E, GALE D, *et al.* Defective angiogenesis, endothelial migration, proliferation, and MAPK signaling in RAP1B-deficient mice[J]. *Blood*, 2018,111(5):2647-2656.
- [19] LI Y, LIU Y, SHI F, *et al.* Knockdown of RAP1B Enhances Apoptosis and Autophagy in Gastric Cancer Cells via the PI3K/Akt/mTOR Pathway[J]. *Oncology research*, 2016,24(5):287-293.
- [20] LIN K T, YEH Y M, CHUANG C M, *et al.* Glucocorticoids mediate induction of microRNA-708 to suppress ovarian cancer metastasis through targeting RAP1B[J]. *Nature communications*, 2015,6:5917.
- [21] SHE X, YU Z, CUI Y, *et al.* miR-181 subunits enhance the chemosensitivity of temozolomide by Rap1B-mediated cytoskeleton remodeling in glioblastoma cells[J]. *Medical Oncology*, 2014,31(4):892. doi: 10.1007/s12032-014-0892-9.
- [22] INFANTE E, HEASMAN S J, RIDLEY A J. Statins inhibit T-acute lymphoblastic leukemia cell adhesion and migration through RAP1B[J]. *J Leukoc Biol*, 2011,89(4):577-586.
- [23] XU J H, ZHAO W Y, FANG Q Q, *et al.* Long Noncoding RNA LUADT1 Is Upregulated in Melanoma and May Sponge miR-28-5p to Upregulate RAP1B[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2020,35(4):307-312.
- [24] WANG P, GU J, WANG K, *et al.* miR-206 inhibits thyroid cancer proliferation and invasion by targeting RAP1B[J]. *J Cell Biochem*, 2019,120(11):18927-18936.
- [25] TANG Z, PENG H, CHEN J, *et al.* Rap1b enhances the invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells by up-regulating Twist 1[J]. *Exp Cell Res*, 2018,367(1):56-64.
- [26] LI Z, XU C, DING B, *et al.* Long non-coding RNA MALAT1 promotes proliferation and suppresses apoptosis of glioma cells through derepressing Rap1B by sponging miR-101[J]. *J Neurooncol*, 2017,134(1):19-28.
- [27] ZHANG M, ZHOU S, ZHANG L, *et al.* miR-518b is down-regulated, and involved in cell proliferation and invasion by targeting RAP1B in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *FEBS letters*, 2012,586(19):3508-3521.
- [28] YANG Y, LI M, YAN Y, *et al.* Expression of RAP1B is associated with poor prognosis and promotes an aggressive phenotype in gastric cancer[J]. *Oncology reports*, 2015,34(5):2385-2394.
- [29] BISCHOFF A, HUCK B, KELLER B, STROTBEC M, *et al.* miR149 functions as a tumor suppressor by controlling breast epithelial cell migration and invasion[J]. *Cancer Res*, 2014,74(18):5256-5265.

(收稿日期:2023-02-04;修回日期:2024-03-15;编辑:黎仕娟)

(上接第 479 页)

- [23] SHEN H, YU H, LI Q Y, *et al.* Hepatocyte-derived VEGFA accelerates the progression of non-alcoholic fatty liver disease to hepatocellular carcinoma via activating hepatic stellate cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022,43(11):2917-2928.
- [24] BASU S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients[J]. *Toxicology*, 2003,189(1-2):113-127.
- [25] ZHOU Y, LONG D, ZHAO Y, *et al.* Oxidative stress-mediated mitochondrial fission promotes hepatic stellate cell activation via stimulating oxidative phosphorylation[J]. *Cell Death Dis*, 2022,3(8):689.
- [26] ZHANG L, ZHANG H, GU J, *et al.* Glabridin inhibits liver fibrosis and hepatic stellate cells activation through suppression of inflammation and oxidative stress by activating PPARgamma in carbon tetrachloride-treated mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022,113(Pt B):109433.
- [27] SVEGLIATI-BARONI G, DI SARIO A, CASINI A, *et al.* The Na⁺/H⁺ exchanger modulates the fibrogenic effect of oxidative stress in rat hepatic stellate cells[J]. *J Hepatol*, 1999,30(5):868-875.
- [28] LUO L, ZHANG G, MAO L, *et al.* Group II muscarinic acetylcholine receptors attenuate hepatic injury via Nrf2/ARE pathway[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020,395:114978.
- [29] HAN C Y, SUN T T, XV G P, *et al.* Berberine ameliorates CCl4-induced liver injury in rats through regulation of the Nrf2-Keap1-ARE and p53 signaling pathways[J]. *Mol Med Rep*, 2019,20(4):3095-3102.
- [30] MA J Q, DING J, ZHANG L, *et al.* Protective effects of ursolic acid in an experimental model of liver fibrosis through Nrf2/ARE pathway[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2015,39(2):188-197.
- [31] 杨帆,童婧涵,李会,等.还原型谷胱甘肽联合高通量血液透析对急性肾损伤患者血清 CysC、KIM-1 及 Scr 的影响[J]. *西部医学*, 2020,32(6):863-867.
- [32] 郭尹玲,扈晓宇,钟森,等.附子对免疫性肝损伤模型大鼠的影响及代谢组学研究[J]. *西部医学*, 2010,22(5):797-799.

(收稿日期:2023-02-05;修回日期:2024-02-04;编辑:黎仕娟)