

# 基于MAPK信号转导通路探究 异甘草酸镁对刀豆蛋白A诱导小鼠 急性肝损伤的保护机制

王俊文<sup>1</sup>, 范子豪<sup>2</sup>, 田原<sup>2</sup>, 徐玲<sup>2</sup>, 高耀<sup>2</sup>, 曹亚玲<sup>2</sup>, 潘桢桢<sup>2</sup>, 张向颖<sup>2</sup>, 宋岩<sup>1</sup>, 任锋<sup>2</sup> (1.北京市垂杨柳医院 检验科, 北京 100022; 2.首都医科大学附属北京佑安医院 北京肝病研究所, 北京 100069)

**摘要:** **目的** 探讨异甘草酸镁(magnesium isoglycyrrhizinate, MgIG)在刀豆蛋白A(concanavalin A, Con A)诱导的小鼠急性肝损伤中的作用及机制。**方法** 按照简单随机分组法将20只无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级Balb/c小鼠分为正常对照组(4只)、MgIG组(4只)、Con A组(6只)、Con A + MgIG干预组(6只)。小鼠Con A(25 mg/kg)尾静脉注射12 h, 构建急性肝损伤模型, 干预组提前1 h给予MgIG(30 mg/kg)腹腔注射。检测丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和天门冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)水平、白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、干扰素诱导蛋白10(interferon-inducible protein-10, IP-10)水平, 检测IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IP-10的mRNA相对表达量。体外实验中小鼠腹腔单核巨噬细胞用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, 200 ng/ml)分别处理30 min、1 h、2 h和4 h, 干预组小鼠腹腔单核巨噬细胞用MgIG(25  $\mu$ g/ml)预处理1 h, 检测IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IP-10炎症因子及磷酸化-p38丝裂原活化蛋白激酶(phospho-p38 mitogen activated protein kinase, p-p38)、磷酸化-c-Jun氨基末端激酶(phospho-c-JunN-terminal kinases, p-JNK)、磷酸化-细胞外调节蛋白激酶(phospho-extracellular regulated protein kinases, p-Erk)蛋白表达。**结果** 与Con A组相比, Con A + MgIG干预病理切片炎性细胞浸润明显减少, 血清炎症因子[IL-6: (10695.71  $\pm$  4861.94) pg/ml vs (27650.88  $\pm$  5701.79) pg/ml; IL-1 $\beta$ : (13.37  $\pm$  8.18) pg/ml vs (56.55  $\pm$  9.29) pg/ml; IP-10: (3298.43  $\pm$  534.95) pg/ml vs (7413.38  $\pm$  1497.78) pg/ml; TNF- $\alpha$  (63.27  $\pm$  13.97) pg/ml vs (97.06  $\pm$  21.26) pg/ml]及mRNA相对表达量(IL-6: 5.23  $\pm$  1.63 vs 16.06  $\pm$  4.55; IL-1 $\beta$ : 0.88  $\pm$  0.45 vs 5.44  $\pm$  0.94; IP-10: 126.24  $\pm$  29.54 vs 454.40  $\pm$  114.81; TNF- $\alpha$ : 9.55  $\pm$  2.75 vs 16.46  $\pm$  3.98)均显著降低( $P$ 均 $<$  0.05)。体外实验表明, 与LPS诱导的模型组相比, MgIG干预组p-p38、p-Jnk、p-Erk蛋白水平明显降低, 同时炎症因子mRNA相对表达量(IL-6: 3627.91  $\pm$  1491.16 vs 6630.40  $\pm$  1149.59; IL-1 $\beta$ : 259.92  $\pm$  49.47 vs 658.06  $\pm$  95.06; IP-10: 4088.38  $\pm$  790.20 vs 7762.08  $\pm$  1007.42; TNF- $\alpha$ : 117.09  $\pm$  15.29 vs 194.56  $\pm$  25.14)也显著降低( $P$ 均 $<$  0.05)。**结论** MgIG通过MAPK信号转导通路降低炎症反应显著改善Con A诱导的小鼠急性肝损伤, 为MgIG在改善肝损伤的功能提供了理论支持。

**关键词:** 急性肝损伤; 异甘草酸镁; 刀豆蛋白A; 炎症反应; 丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2023.04.009

基金项目: 国家自然科学基金项目(81770611、82002243); 北京自然科学基金和北京市教委联合资助重点项目(KZ202010025035); 首都卫生发展科研专项重点攻关项目(首发2020-1-1151, 首发2021-1G-2181); 北京市科技计划“首都临床诊疗技术研究及示范应用”专项课题(Z191100006619096、Z191100006619097); 北京市优秀人才培养项目(2018000021469G289); 北京市医院管理中心“青苗”计划专项经费资助(QML20201702)

通讯作者: 任锋 Email: renfeng7512@ccmu.edu.cn

### Magnesium isoglycyrrhizinate against concanavalin A-induced acute liver injury in mice based on MAPK signaling pathway

Wang Junwen<sup>1</sup>, Fan Zihao<sup>2</sup>, Tian Yuan<sup>2</sup>, Xu Ling<sup>2</sup>, Gao Yao<sup>2</sup>, Cao Yaling<sup>2</sup>, Pan Zhenzhen<sup>2</sup>, Zhang Xiangying<sup>2</sup>, Song Yan<sup>1</sup>, Ren Feng<sup>2</sup> (1.Department of Clinical Laboratory, Beijing Chuiyangliu Hospital, Beijing 100022, China; 2.Beijing Institute of Hepatology, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

**Abstract: Objective** To investigate the role and mechanism of magnesium isoglycyrrhizinate (MgIG) in concanavalin A (Con A)-induced acute liver injury. **Methods** In vivo experiments, 20 specific pathogen free (SPF) Balb/c mice were randomly divided into normal control group (4 cases), MgIG control group (4 cases), Con A model group (6 cases) and Con A + MgIG intervention group (6 cases) by simple randomization grouping method. The mice were injected with Con A (25 mg/kg) intravenously into the tail vein for 12 h to establish an acute liver injury model, and the intervention mice were injected with MgIG (30 mg/kg) intraperitoneally 1 h earlier. Levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interferon-inducible protein-10 (IP-10) were detected. The relative mRNA expression levels of IL-6, IL-1  $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IP-10 were also detected. For in vitro experiments, the mice peritoneal mononuclear macrophages were treated with lipopolysaccharide (LPS, 200 ng/ml) for 30 min, 1 h, 2 h and 4 h, and the mice peritoneal mononuclear macrophages in the intervention group were pretreated with MgIG (25  $\mu$ g/ml) for 1 h, and the expression of inflammatory factors (IL-6, IL- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IP-10) and related proteins [phospho-p38 mitogen activated protein kinase (p-p38), phospho-c-JunN-terminal kinases (p-JNK), phospho-extracellular regulated protein kinases (p-Erk)] were detected. **Results** Compared with those in Con A model group, the inflammatory cell infiltration of mice in Con A + MgIG intervention group reduced significantly, serum inflammatory factors [IL-6: (10695.71  $\pm$  4861.94) pg/ml vs (27650.88  $\pm$  5701.79) pg/ml; IL-1 $\beta$ : (13.37  $\pm$  8.18) pg/ml vs (56.55  $\pm$  9.29) pg/ml; IP-10: (3298.43  $\pm$  534.95) pg/ml vs (7413.38  $\pm$  1497.78) pg/ml; TNF- $\alpha$  (63.27  $\pm$  13.97) pg/ml vs (97.06  $\pm$  21.26) pg/ml] and relative mRNA expression levels (IL-6: 5.23  $\pm$  1.63 vs 16.06  $\pm$  4.55; IL-1 $\beta$ : 0.88  $\pm$  0.45 vs 5.44  $\pm$  0.94; IP-10: 126.24  $\pm$  29.54 vs 454.40  $\pm$  114.81; TNF- $\alpha$ : 9.55  $\pm$  2.75 vs 16.46  $\pm$  3.98) also reduced significantly (all  $P$  < 0.05). Results of in vitro experiments showed that compared with those in LPS model group, the levels of p-p38, p-Jnk and p-Erk proteins in the MgIG intervention group reduced significantly, the relative mRNA expression levels of inflammatory factor genes (IL-6: 3627.91  $\pm$  1491.16 vs 6630.40  $\pm$  1149.59; IL-1 $\beta$ : 259.92  $\pm$  49.47 vs 658.06  $\pm$  95.06; IP-10: 4088.38  $\pm$  790.20 vs 7762.08  $\pm$  1007.42; TNF- $\alpha$ : 117.09  $\pm$  15.29 vs 194.56  $\pm$  25.14) also reduced significantly (all  $P$  < 0.05). **Conclusions** MgIG can remarkably ameliorate Con A-induced acute liver injury in mice by reducing the inflammatory response through MAPK signaling transduction pathway, which provided theoretical support for the ability of MgIG to recover liver injury in clinic.

**Key words:** Acute liver injury; Magnesium isoglycyrrhizinate; Concanavalin A; Inflammatory response; Mitogen-activated protein kinase signaling transduction pathway

急性肝衰竭 (acute liver failure, ALF) 是指在短时间内发生大量肝细胞坏死及严重肝功能损害, 并引起肝性脑病的一组严重临床综合征。其中约半数以上患者因多器官功能衰竭而死亡<sup>[1,2]</sup>。ALF死

亡率较高, 虽然肝移植能够提高患者的存活率, 但临床上在治疗ALF方面仍缺乏有效的药物及手段<sup>[3]</sup>。异甘草酸镁 (magnesium isoglycyrrhizinate, MgIG) 是一种主要由18 $\alpha$ -甘草酸立体异构体组成

的镁盐,临床上常作为应对急性肝损伤的药物。MgIG是一种从中药甘草中提取的新型甘草酸,属于第4代甘草酸制剂,且具有多种药理活性,如抗病毒、抗菌、抗炎、抗肿瘤等<sup>[4]</sup>。研究表明,MgIG可通过调节脂质代谢和内质网应激减轻急性酒精诱导的肝脂肪变<sup>[5]</sup>。MgIG可通过抑制氧化应激、炎症和凋亡来抑制三氧化二砷诱导的急性肝损伤小鼠模型的肝毒性<sup>[6]</sup>。因此,MgIG作为一种肝保护剂被广泛应用于改善肝损伤<sup>[7]</sup>。然而,目前关于MgIG对刀豆蛋白A(concanavalin A, Con A)诱导的急性肝损伤作用机制的研究较少,尤其是其在免疫性肝损伤中的抗炎机制尚不明确。

Con A是一种从植物中提取的凝集素样多糖,目前用于模拟乙型肝炎相关的免疫性肝损伤<sup>[8]</sup>。在免疫性ALF中,自身免疫反应的激活和随后的炎症反应构成了发病机制的关键。此后,许多炎症因子和免疫细胞类型在肝脏中积聚,攻击受损或正常的肝脏组织并造成不可逆的损伤。多种炎症通路被多种促炎因子激活,如白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和趋化因子,导致肝损伤和坏死<sup>[9,10]</sup>。目前,许多研究都集中在与肝脏炎症密切相关的丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号转导通路的机制上。然而,MgIG是否通过MAPK途径减轻Con A诱导的肝损伤及其机制仍不明确。因此,本研究旨在探讨MgIG对Con A诱导的免疫性肝损伤的潜在治疗机制,并揭示MgIG基于MAPK信号转导通路在Con A诱导的肝损伤中发挥的抗炎作用的潜在分子机制。

## 1 资料与方法

**1.1 实验动物** 30只无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雄性野生型(Balb/c)小鼠(8~10周龄)购自中国维通利华公司。在研究期间,所有动物都被饲养在无病原体环境条件、温度为(23 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C的空调房间,光照/黑暗周期为12 h。在实验开始前动物自由摄取水和食物,适应性喂养1周。所有实验严格按照首都医科大学动物实验委员会的伦理规范进行且实验方案经首都医科大学动物保护与使用委员会(IACUC)批准后执行(AEEI-2020-009)。

**1.2 分组** 20只小鼠按照简单随机分组法分为4组:正常对照组(4只)、MgIG对照组(4只)、Con A模型组(6只)、MgIG干预组(6只)。Con A模型组和MgIG干预组小鼠尾静脉注射溶解在PBS中的Con A(25 mg/kg, Sigma, 美国)诱导ALF。正常对照组和MgIG对照组根据小鼠体质量注射等量PBS。

MgIG对照组、MgIG干预组小鼠于Con A给药前1 h腹腔注射溶于0.9%生理盐水的MgIG(30 mg/kg,正大天晴药业集团股份有限公司)。Con A刺激12 h后,注射麻醉剂(4%水合氯醛,0.20 ml/20 g)处死小鼠,收集肝组织和外周血血清。血清样本和肝组织样本保存在-80 $^{\circ}$ C备用。

**1.3 小鼠腹腔单核巨噬细胞的提取** 剩余10只小鼠麻醉后(4%水合氯醛,0.20 ml/20 g)脱颈处死,浸于75%酒精溶液中消毒。无菌剪开小鼠腹部外层皮肤,充分暴露腹膜,向腹腔内注射无菌RPMI 1640培养基(美国赛默飞公司)液约5 ml,轻揉小鼠腹部10~15 min后用注射器将腹腔液抽出,置于无菌离心管中。收集的腹腔液经离心、洗涤后制成细胞悬液,铺板于细胞培养皿中。37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>孵育4 h,弃去培养液即贴壁纯化的巨噬细胞单层。

**1.4 细胞实验** 将提取的小鼠腹腔单核巨噬细胞培养在含有10%胎牛血清(美国赛默飞公司)和1%青霉素双抗(美国赛默飞公司)的RPMI 1640培养基(美国赛默飞公司)中,培养条件为:37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>。小鼠腹腔单核巨噬细胞用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(200 ng/ml, Sigma, 美国)分别处理30 min、1 h、2 h和4 h,干预组小鼠腹腔单核巨噬细胞用MgIG(25  $\mu$ g/ml)预处理1 h,提取细胞蛋白及总RNA -80 $^{\circ}$ C保存备用。

**1.5 肝功能检测及病理切片** 采用多参数分析仪(AU 5400, 日本奥林巴斯)检测血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)水平,作为肝损伤的标志物。观察肝组织病理切片,经福尔马林固定的肝组织石蜡包埋后,按标准方法苏木精和伊红(HE)染色,光学显微镜下观察炎症细胞浸润情况。

**1.6 实时荧光定量聚合酶链式反应** 用Trizol试剂从肝组织或细胞中提取RNA。然后使用cDNA合成试剂盒(日本TaKaRa生物公司)将总量1  $\mu$ g RNA反转录成cDNA。最后聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)在20  $\mu$ l体系中进行,该体系由10  $\mu$ l SYBR Green(日本TaKaRa生物公司)、4  $\mu$ l cDNA、0.4  $\mu$ l每个引物(10  $\mu$ mol/L,引物序列见表1)和5.2  $\mu$ l二乙基焦碳酸酯水(DEPC水)组成,用定量PCR仪(ABI Prism7500;美国应用生物系统公司)进行测定。反应条件为:50 $^{\circ}$ C反应2 min,95 $^{\circ}$ C反应5 min,然后,95 $^{\circ}$ C反应15 s,60 $^{\circ}$ C反应30 s,55 $^{\circ}$ C反应4 s,44个循环,4 $^{\circ}$ C循环保存。以次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶

(hypoxanthine phosphoribosyl transferase, HPRT) 为对照, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算IL-6、IL- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、干扰素诱导蛋白10 (interferon-inducible protein-10, IP-10) 的mRNA相对表达量。

1.7 免疫印迹 (Western blot) 实验 用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解工作液提取细胞中总蛋白。根据试剂盒说明, 使用BCA蛋白测定试剂盒 (北京博迈德基因技术有限公司) 进行蛋白定量。首先用SDS-12%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, 然后在4℃下转移到PVDF膜上过夜。 $\beta$ -Actin、p-Erk、p-Jnk和p-p38一抗 [1:1000, 美国细胞信号传导技术 (CST) 公司] 在TBST中用5%脱脂奶粉稀释, 然后与抗体在4℃慢摇过夜。在TBST中洗涤90 min后, 在室温下与辣根过氧化物酶偶联二抗 [1:2000, 美国细胞信号传导技术 (CST) 公司] 孵育60 min, 然后在TBST中洗涤90 min。使用增效化学发光试剂盒 (美国赛默飞公司) 曝光 $\beta$ -Actin、p-Erk、p-Jnk和p-p38目标蛋白条带。

1.8 血清炎症因子水平测定 根据试剂盒说明, 使用Luminex Milliplex<sup>®</sup> MAP试剂盒 (美国默克公司小鼠细胞因子/趋化因子磁珠面板, 96孔板法) 测定血清IL-6、IL- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IP-10细胞因子水平, 并使用Luminex 200系统分析结果。

1.9 统计学处理 使用IBM SPSS 25.0软件对数据进行统计学分析, 所有实验至少独立进行3次。小鼠血清ALT和AST水平以及炎症相关细胞因子水平、小鼠组织中炎症相关细胞因子mRNA的相对表达量、小鼠腹腔巨噬细胞炎症的相关mRNA的相对表达量均为计量资料, 符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用方差分析, 两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 MglG减轻了Con A诱导的小鼠急性肝损伤 与正常对照组相比, Con A组小鼠血清ALT、AST水平显著升高 ( $P$ 均 $< 0.05$ ); MglG干预后, 与Con A组相比, ALT、AST水平均显著降低 ( $P$ 均 $< 0.05$ ), 肝损伤得到改善 (表2)。肝脏外观形态也证明了这一点, Con A模型组呈现明显淤血损伤状态, 而Con A + MglG干预组则明显减轻 (图1)。这表明MglG能够明显改善Con A诱导的急性肝损伤。

2.2 MglG降低了Con A诱导的小鼠急性肝损伤的炎症反应 小鼠肝脏组织病理切片HE染色结果显示, Con A组小鼠肝脏组织中有大量炎性细胞浸润; Con A + MglG干预组炎性细胞浸润显著减少, 见图2。与正常对照组相比, Con A模型组小鼠血清中炎症相关细胞因子IL-6、IL- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IP-10显著升高 ( $P$ 均 $< 0.05$ ); MglG干预降低了血清中IL-6、IL- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IP-10的水平 ( $P < 0.05$ ), 见表3。提示MglG能够明显降低Con A诱导的小鼠急性肝损伤的

表2 各组小鼠血清 ALT 和 AST 水平 ( $\bar{x} \pm s$ , U/L)

组别	ALT	AST
正常对照组	44.30 $\pm$ 19.89	36.65 $\pm$ 10.20
MglG组	31.00 $\pm$ 16.59	31.25 $\pm$ 8.42
Con A组	11228.15 $\pm$ 1150.30	10069.42 $\pm$ 1029.23
Con A + MglG干预组	5196.17 $\pm$ 807.50	5913.00 $\pm$ 1619.16
$F$ 值	232.11	103.09
$P$ 值	$< 0.0001$	$< 0.0001$
$t_1$ 值	-19.05	-19.101
$P_1$ 值	$< 0.0001$	$< 0.0001$
$t_2$ 值	10.51	5.31
$P_2$ 值	$< 0.0001$	0.0003

注:  $t_1$ 、 $P_1$  为正常对照组和 Con A 模型组相比;  $t_2$ 、 $P_2$  为 Con A 组和 Con A + MglG 干预组相比。

表1 实时荧光定量 PCR 引物序列

目标基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
IL-6基因	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	TCCACGATTTCACAGAGAAC
IL-1 $\beta$ 基因	GCCCATCCTCTGTGACTCAT	AGGCCACAGGTATTTTGTCG
IP-10基因	AAGTGCTGCCGTCATTTTCT	GTGGCAATGATCTCAACACG
TNF- $\alpha$ 基因	CGTCAGCCGATTGCTATCT	CGGACTCCGCAAAGTCTAAG

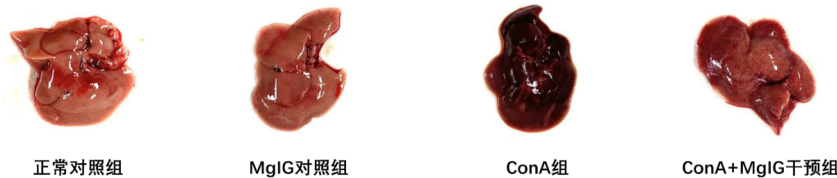


图1 MglG 干预可明显改善 Con A 诱导的小鼠急性肝损伤

注: 正常对照组和 MglG 组肝脏颜色红润, 质地柔软且无明显损伤; Con A 组肝脏颜色暗沉, 外观呈明显损伤, 可见明显淤血; Con A + MglG 干预组肝脏暗沉淤血明显减轻, 仍可见明显损伤。

炎症反应。

**2.3 MgIG降低了Con A诱导的小鼠肝脏组织中炎症相关基因的表达水平** 与正常对照组相比, Con A组IL-6、IL- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IP-10 mRNA相对表达量显著增高 ( $P$ 均 $< 0.05$ ); 与Con A组相比, Con A + MgIG干预组IL-6、IL- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IP-10 mRNA相对表达量显著降低 ( $P$ 均 $< 0.05$ ), 见表4。这进一步表明MgIG降低了Con A诱导的小鼠急性肝损伤中炎症相关基因的表达。

**2.4 MgIG通过MAPK信号转导通路降低LPS诱导的小鼠腹腔巨噬细胞炎症的表达** 在体外实验中, LPS成功诱导了体外巨噬细胞炎症相关蛋白及基因的表达。与LPS诱导的模型组相比, LPS + MgIG干预组p-p38、p-Jnk、p-Erk蛋白水平显著降低 (图4), 同时炎症因子IL-6、IL- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IP-10 mRNA表达水平显著降低 (表5)。这进一步表明, MgIG降低炎症反应可能是通过MAPK信号通路实现的。

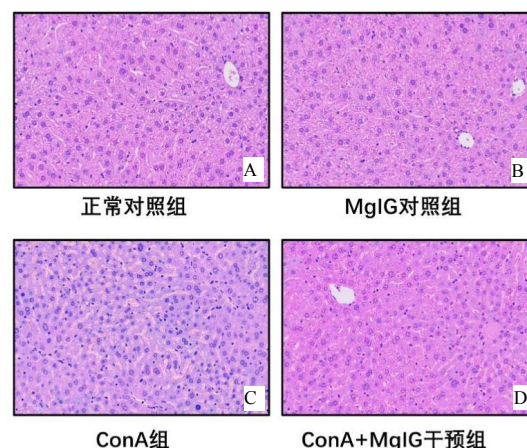


图2 MgIG降低了Con A诱导的小鼠急性肝损伤的炎症反应 (HE染色,  $\times 200$ )

注: 图为各组小鼠肝脏组织切片, 正常对照组 (A) 和MgIG组 (B) 小鼠肝细胞形态正常, 核圆居中或有双核, 且肝细胞排列规则、致密, 无或少见炎症细胞; Con A组 (C) 小鼠肝细胞及核形态各异, 肝血窦内有大量红细胞积聚, 且有大量炎症细胞浸润; Con A + MgIG干预组 (D) 小鼠肝细胞及核形态各异, 肝血窦内红细胞积聚减少, 炎症细胞浸润减少。

表3 各组小鼠血清中炎症相关细胞因子水平 ( $\bar{x} \pm s$ , pg/ml)

组别	IL-6	IL-1 $\beta$	IP-10	TNF- $\alpha$
正常对照组	4.07 $\pm$ 2.96	3.06 $\pm$ 1.82	174.03 $\pm$ 26.94	4.08 $\pm$ 1.65
MgIG组	3.73 $\pm$ 82.40	3.55 $\pm$ 0.92	114.12 $\pm$ 16.97	3.55 $\pm$ 0.99
Con A组	27650.88 $\pm$ 5701.79	56.55 $\pm$ 9.29	7413.38 $\pm$ 1497.78	97.06 $\pm$ 21.26
Con A + MgIG干预组	10695.71 $\pm$ 4861.94	13.37 $\pm$ 8.18	3298.43 $\pm$ 534.95	63.27 $\pm$ 13.97
F值	53.24	78.83	77.24	51.83
P值	$< 0.0001$	$< 0.0001$	$< 0.0001$	$< 0.0001$
$t_1$ 值	-9.46	-11.14	-9.43	-8.52
$P_1$ 值	$< 0.0001$	$< 0.0001$	$< 0.0001$	$< 0.0001$
$t_2$ 值	6.15	9.49	6.87	3.58
$P_2$ 值	$< 0.0001$	$< 0.0001$	$< 0.0001$	0.003

注:  $t_1$ 、 $P_1$  为正常对照组和 ConA 模型组相比;  $t_2$ 、 $P_2$  为 Con A 组和 Con A + MgIG 干预组相比。

表4 各组小鼠肝组织中炎症相关 mRNA 相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	IL-6	IL-1 $\beta$	IP-10	TNF- $\alpha$
正常对照组	2.22 $\pm$ 0.95	1.19 $\pm$ 0.73	1.43 $\pm$ 1.02	1.78 $\pm$ 0.73
MgIG组	3.91 $\pm$ 1.73	1.30 $\pm$ 0.83	1.68 $\pm$ 1.55	4.89 $\pm$ 0.70
Con A组	16.06 $\pm$ 4.55	5.44 $\pm$ 0.94	454.40 $\pm$ 114.81	16.46 $\pm$ 3.98
Con A + MgIG干预组	5.23 $\pm$ 1.63	0.88 $\pm$ 0.45	126.24 $\pm$ 29.54	9.55 $\pm$ 2.75
F值	45.28	90.47	90.60	43.18
P值	$< 0.0001$	$< 0.0001$	$< 0.0001$	$< 0.0001$
$t_1$ 值	-7.27	-9.65	-9.52	-8.82
$P_1$ 值	$< 0.0001$	$< 0.0001$	$< 0.0001$	$< 0.0001$
$t_2$ 值	7.77	15.12	9.59	4.94
$P_2$ 值	$< 0.0001$	$< 0.0001$	$< 0.0001$	$< 0.0001$

注:  $t_1$ 、 $P_1$  为正常对照组和 Con A 模型组相比;  $t_2$ 、 $P_2$  为 Con A 组和 Con A + MgIG 干预组相比。

表5 正常对照组、MgIG 对照组、LPS 组、LPS + MgIG 干预组小鼠腹腔巨噬细胞炎症相关 mRNA 的相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	IL-6	IL-1 $\beta$	IP-10	TNF- $\alpha$
正常对照组	0.86 $\pm$ 0.29	0.51 $\pm$ 0.37	0.77 $\pm$ 0.36	0.77 $\pm$ 0.57
MgIG组	1.20 $\pm$ 0.51	0.36 $\pm$ 0.23	1.22 $\pm$ 0.88	0.57 $\pm$ 0.19
LPS组	6630.40 $\pm$ 1149.59	658.06 $\pm$ 95.06	7762.08 $\pm$ 1007.42	194.56 $\pm$ 25.14
LPS + MgIG干预组	3627.91 $\pm$ 1491.16	259.92 $\pm$ 49.47	4088.38 $\pm$ 790.20	117.09 $\pm$ 15.29
F值	57.71	169.55	169.77	206.93
P值	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
t <sub>1</sub> 值	-11.30	-13.56	-15.10	-15.10
P <sub>1</sub> 值	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
t <sub>2</sub> 值	3.91	9.10	7.03	6.45
P <sub>2</sub> 值	0.003	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

注: t<sub>1</sub>、P<sub>1</sub> 为正常对照组和 LPS 模型组相比; t<sub>2</sub>、P<sub>2</sub> 为 LPS 组和 LPS + MgIG 干预组相比。

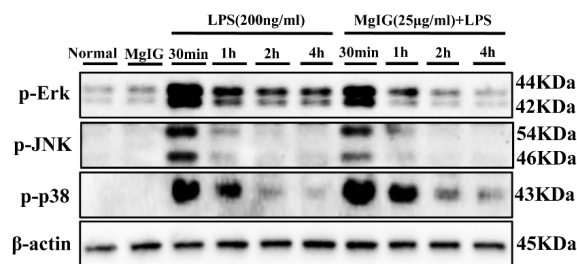


图4 MgIG 通过 MAPK 信号通路降低 LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞炎症的表达

注: Normal 为正常对照组; MgIG 为 MgIG 对照组; LPS 为 LPS 模型组; MgIG + LPS 为 MgIG 干预组。

3 讨论

ALF的治疗依旧是一个全球性问题。在ALF的发生发展过程中,炎症反应扮演极为重要的角色,是多种肝脏疾病(包括病毒性肝炎、遗传性代谢性肝病)发生急性肝损伤甚至发展为ALF的主要原因之一。大量研究表明,ALF的发病机制涉及免疫反应介导的炎症。在此过程中,病毒或自身抗体等激活中性粒细胞或单核巨噬细胞等,并刺激效应T细胞和其他免疫细胞释放大量多功能细胞因子从而诱导炎症反应的发生<sup>[11,12]</sup>。不仅如此,多种细胞因子也在体内发挥抗炎或促炎作用,从而改善或加重损伤<sup>[9,13]</sup>。肝脏作为人体特殊的免疫器官和免疫攻击部位,血清促炎因子的增加会促进肝细胞凋亡和坏死,导致组织炎症。Con A作为一种从刀豆中提取的T细胞有丝分裂原和植物血凝素<sup>[14]</sup>,能够通过激活自然杀伤细胞和T细胞来诱导免疫性肝损伤<sup>[15]</sup>,并由于其对肝窦的高亲和力而选择性地凝结在肝脏中,导致大量炎性细胞浸润<sup>[16]</sup>。肝窦内有大量的固有巨噬细胞,Con A激活T细胞后刺激效应T细胞和巨噬细胞共同产生过量的TNF- $\alpha$ 、IL等细胞因子,引发细胞因子风暴,进一步激活肝脏中的库普弗细胞,诱发细胞因子依赖性肝损伤。而肝门区大量浸润的炎性细胞增

加了TNF- $\alpha$ 、IP-10、IL-6和IL-1 $\beta$ 等促炎细胞因子的分泌水平,也进一步加剧了肝脏的免疫损伤。由此可见,Con A诱导的免疫性急性肝损伤过程中,炎症反应加剧了肝损伤是发展为ALF的关键因素之一。

肝脏炎症反应依赖于多种细胞信号通路调节。MAPK通路就是其中一个重要的信号转导系统,介导细胞内外刺激信号的应答。MAPK信号转导通路可诱导下游多种凋亡蛋白的表达,导致凋亡的发生,从而加重损伤。特别是MAPK信号转导通路的激活在早期促进了炎症反应的发生,IL-6、IL- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IP-10等炎症因子表达增高,随后会促进细胞的凋亡<sup>[17,18]</sup>。MAPK通路包括4个亚家族:细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, Erk1/2)、c-Jun氨基末端激酶(c-JunN-terminal kinases, JNK)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen activated protein kinase, p38)、细胞外信号调节激酶5(extracellular signal regulated kinase, ERK5)。Erk广泛分布于各种组织,参与调节细胞增殖、分化和生长<sup>[17]</sup>。JNK是各种应激源诱导的信号转导的关键分子,参与细胞对辐射、渗透压、温度变化和有毒物质的响应。此外, p38介导炎症和细胞凋亡,是多种抗炎药物<sup>[19]</sup>的靶点。研究表明,许多药物可通过MAPK信号转导通路减轻炎性肝损伤,减少促炎细胞因子的分泌<sup>[20]</sup>。因此,在Con A诱导的免疫性急性肝损伤过程中, MAPK信号转导通路可能成为降低炎症反应的关键靶点。在本研究中,即明确了MgIG的干预对早期MAPK信号转导通路有明显的抑制作用,从而降低了炎症反应。甘草酸制剂由于其出色的抗炎和保肝作用,在世界范围内被作为临床治疗肝病的一线药物,在中国和日本的肝病临床指南中<sup>[12]</sup>,甘草酸制剂也被推荐为首选的保肝药。MgIG作为最新一代甘草酸制剂,具有活性增强、不良反应减少的特点。同时因其能够改善急性病毒性肝炎的炎症反应、保护非酒精性脂肪性



肝病和降低药物性肝损伤等而备受关注<sup>[21-23]</sup>。但目前MgIG的保肝作用及机制研究多基于D-GaIN/LPS、CCl<sub>4</sub>等实验动物模型,而在Con A诱导的免疫性肝损伤中的研究相对较少。因此,本研究是基于MAPK信号转导通路来研究MgIG对Con A诱导小鼠急性肝损伤的保护作用及机制。在这项研究中,MgIG在明显改善Con A诱导小鼠急性肝损伤的同时降低了肝组织中炎性细胞的浸润和血清TNF- $\alpha$ 、IP-10、IL-6和IL-1 $\beta$ 等促炎细胞因子的分泌水平,由此可证明MgIG在一定程度上通过降低炎症反应改善急性肝损伤;不仅如此,通过体外实验进一步阐明了MgIG通过MAPK信号转导通路抑制TNF- $\alpha$ 、IP-10、IL-6和IL-1 $\beta$ 等促炎细胞因子的分泌水平。在MgIG药物浓度的选择上,在其他研究中,MgIG的工作浓度为高(50 mg/kg)和低(25 mg/kg)两个浓度<sup>[6]</sup>,而在另一个研究中,MgIG治疗组的注射剂量为30 mg/kg<sup>[24]</sup>,因此本研究以30 mg/kg这一浓度作为实验浓度。此外,我们还在初步实验中探讨了MgIG的安全性,不同浓度(0~1600  $\mu$ g/ml) MgIG对小鼠腹腔单核巨噬细胞无显著毒性,因此选择了作用的最小浓度25  $\mu$ g/ml。

综上所述,MgIG在Con A诱导的急性肝损伤发生发展过程中发挥了降低炎症反应的作用,尤其是降低了TNF- $\alpha$ 、IP-10、IL-6和IL-1 $\beta$ 等促炎细胞因子的分泌水平,其主要是通过MAPK信号转导通路调节炎症反应改善急性肝损伤,从而减缓发展为ALF的进程。故而,该研究阐明了MgIG作为一种保肝剂的相关治疗机制,并为MgIG治疗肝病提供了坚实的理论基础。

## 参考文献

- [1] 张瑞懿,陈倩,石春霞,龚作炯. 自噬在急性肝衰竭中研究进展[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2022,14(4):10-14.
- [2] European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practical guidelines on the management of acute (fulminant) liver failure[J]. J Hepatol,2017,66(5):1047-1081.
- [3] BISMUTH H. Current status of auxiliary partial orthotopic liver transplantation for acute liver failure[J]. Liver Transpl,2017,23(5):710.
- [4] WANG L, YANG R, YUAN B, et al. The antiviral and antimicrobial activities of licorice, a widely-used Chinese herb[J]. Acta Pharm Sin B,2015,5(4):310-315.
- [5] DAI W, WANG K, ZHEN X, et al. Magnesium isoglycyrrhizinate attenuates acute alcohol-induced hepatic steatosis in a zebrafish model by regulating lipid metabolism and ER stress[J]. Nutr Metab (Lond),2022,19(1):23.
- [6] LIU M, ZHENG B, LIU P, et al. Exploration of the hepatoprotective effect and mechanism of magnesium isoglycyrrhizinate in mice with arsenite-induced acute liver injury[J]. Mol Med Rep,2021,23(6):438.
- [7] 毛海鹰,滕华安,廖礼艳,等. 异甘草酸镁治疗重型肝炎肝衰竭疗效的Meta分析[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2017,9(1):15-19.
- [8] WANG L, ZHANG W, GE C H, et al. Toll-like receptor 5 signaling restrains T-cell/natural killer T-cell activation and protects against concanavalin A-induced hepatic injury[J]. Hepatology, 2017,65(6):2059-2073.
- [9] XU S, NIU P, CHEN K, et al. The liver protection of propylene glycol alginate sodium sulfate preconditioning against ischemia reperfusion injury: focusing MAPK pathway activity[J]. Sci Rep,2017,7(1):15175.
- [10] REN F, ZHOU L, ZHANG X, et al. Endoplasmic reticulum stress-activated glycogen synthase kinase 3 $\beta$  aggravates liver inflammation and hepatotoxicity in mice with acute liver failure[J]. Inflammation,2015,38(3):1151-1165.
- [11] SARIN S K, CHOUDHURY A, SHARMA M K, et al. Acute-on-chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific association for the study of the liver (APASL): an update[J]. Hepatol Int,2019,13(4):353-390.
- [12] GHOSH N, GHOSH R, MANDAL V, et al. Recent advances in herbal medicine for treatment of liver diseases[J]. Pharm Biol,2011,49(9):970-988.
- [13] TANG G H, YANG H Y, ZHANG J C, et al. Magnesium isoglycyrrhizinate inhibits inflammatory response through STAT3 pathway to protect remnant liver function[J]. World J Gastroenterol, 2015,21(43):12370-12380.
- [14] HE X, HONG W, YANG J, et al. Spontaneous apoptosis of cells in therapeutic stem cell preparation exert immunomodulatory effects through release of phosphatidylserine[J]. Signal Transduct Target Ther,2021,6(1):270.
- [15] KODA Y, NAKAMOTO N, CHU P S, et al. Plasmacytoid dendritic cells protect against immune-mediated acute liver injury via IL-35[J]. J Clin Invest,2019,129(8):3201-3213.
- [16] JASIULEWICZ A, LISOWSKA K A, PIETRUCZUK K, et al. Homeostatic 'bystander' proliferation of human peripheral blood B cells in response to polyclonal T-cell stimulation in vitro[J]. Int Immunol,2015,27(11):579-588.
- [17] DONG N, LI X, XUE C, et al. Astragalus polysaccharides alleviates LPS-induced inflammation via the NF- $\kappa$ B/MAPK signaling pathway[J]. J Cell Physiol,2020,235(7-8):5525-5540.
- [18] REN Q, GUO F, TAO S, et al. Flavonoid fisetin alleviates kidney inflammation and apoptosis via inhibiting Src-mediated NF- $\kappa$ B p65 and MAPK signaling pathways in septic AKI mice[J]. Biomed Pharmacother,2020,122:109772.
- [19] LIU F C, LEE H C, LIAO C C, et al. Tropisetron protects against acetaminophen-induced liver injury via suppressing hepatic oxidative stress and modulating the activation of JNK/ERK MAPK pathways[J]. Biomed Res Int,2016,2016:1952947.
- [20] HSU J T, Le PH, LIN C J, et al. Mechanism of salutary effects of melatonin-mediated liver protection after trauma-hemorrhage: p38 MAPK-dependent iNOS/HIF-1 $\alpha$  pathway[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,2017,312(5):G427-G433.
- [21] JIANG W, LIU J, LI P, et al. Magnesium isoglycyrrhizinate shows hepatoprotective effects in a cyclophosphamide-induced model of hepatic injury[J]. Oncotarget,2017,8(20):33252-33264.
- [22] QU B, XING R, WANG H, et al. Multiple effects of magnesium isoglycyrrhizinate on the disposition of docetaxel in docetaxel-induced liver injury[J]. Xenobiotica,2017,47(4):290-296.
- [23] WU Z, ZHANG Y, SONG T, et al. Magnesium isoglycyrrhizinate ameliorates doxorubicin-induced acute cardiac and hepatic toxicity via anti-oxidant and anti-apoptotic mechanisms in mice[J]. Exp Ther Med,2018,15(1):1005-1012.
- [24] JIANG W, XU S, GUO H, et al. Magnesium isoglycyrrhizinate prevents the nonalcoholic hepatic steatosis via regulating energy homeostasis[J]. J Cell Mol Med,2020,24(13):7201-7213.

收稿日期: 2022-05-21

王俊文, 范子豪, 田原, 等. 基于MAPK信号转导通路探究异甘草酸镁对刀豆蛋白A诱导小鼠急性肝损伤的保护机制[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2023,15(4): 47-53.