

本文引用:陶涛,周全,周嘉. ω -3 多不饱和脂肪酸对对乙酰氨基酚诱导小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 新乡医学院学报,2019,36(6):506-510,516. DOI:10.7683/xyxyxb.2019.06.002.

【基础研究】

ω -3 多不饱和脂肪酸对对乙酰氨基酚诱导小鼠急性肝损伤的保护作用

陶涛¹, 周全¹, 周嘉²

(1. 湛江中心人民医院麻醉科, 广东 湛江 524045; 2. 南方医科大学基础医学院免疫学教研室, 广东 广州 510515)

摘要: **目的** 探讨 ω -3 多不饱和脂肪酸(ω -3PUFA)对对乙酰氨基酚(APAP)诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用及机制。**方法** 选取健康 C57BL/6 雌性野生型小鼠(WT组)和 Fat-1 转基因雌性小鼠(Fat-1组)各24只,采用腹腔注射 APAP 法建立小鼠急性肝损伤模型,分别于 APAP 腹腔注射后 0、2、6、24 h 应用 CO₂ 法每组处死 6 只小鼠,采集小鼠肝组织和静脉血。应用丙氨酸转氨酶(ALT)检测试剂盒测定小鼠血清 ALT 水平,苏木精-伊红(HE)染色观察小鼠肝组织形态学变化,Western blot 法检测小鼠肝组织中腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)和磷酸化 AMPK(p-AMPK)水平。取 HepaRG 细胞,应用 APAP 孵育 6 h 诱导 HepaRG 细胞凋亡,换培养液后将细胞分为 APAP + 二十二碳六烯酸(DHA)组和 APAP + 二甲亚砷(DMSO)组,APAP + DHA 组在培养基中加入 DHA,APAP + DMSO 组在培养基中加入 DMSO;分别于处理 0、3、6 h 时收集 HepaRG 细胞,采用 Western blot 法检测 HepaRG 细胞中 AMPK 和 p-AMPK 表达水平。取 HepaRG 细胞并随机分为磷酸盐缓冲液(PBS) + DHA 组、PBS + DMSO 组、APAP + DHA 组和 APAP + DMSO 组,APAP + DHA 组和 APAP + DMSO 组细胞应用 APAP 孵育 6 h 诱导 HepaRG 细胞凋亡,PBS + DHA 组和 PBS + DMSO 组细胞加入 PBS;换培养液后,APAP + DHA 组和 PBS + DHA 组在培养基中加入 DHA,APAP + DMSO 组和 PBS + DMSO 组在培养基中加入 DMSO;各组细胞继续温箱孵育 6 h,收集细胞,采用流式细胞术检测各组 HepaRG 细胞凋亡情况。**结果** 2 组小鼠腹腔注射 APAP 后 2、6、24 h 时血清 ALT 水平显著高于 0 h 时($P < 0.05$);腹腔注射 APAP 后 2、6、24 h 时,Fat-1 组小鼠血清 ALT 水平显著低于 WT 组($P < 0.05$)。HE 染色结果显示,腹腔注射 APAP 后 24 h WT 组小鼠肝细胞呈现不同程度的变性或坏死,细胞核溶解或固缩,肝细胞索正常形态被破坏并伴有明显的炎性细胞浸润;而 Fat-1 组小鼠肝脏组织病变较轻。腹腔注射 APAP 后 2、6 h 时 Fat-1 组小鼠肝组织中 p-AMPK 相对表达量显著高于 WT 组($P < 0.05$);WT 组小鼠腹腔注射 APAP 后 2、6 h 时肝组织中 p-AMPK 相对表达量显著低于 0 h 时($P < 0.05$),Fat-1 组小鼠腹腔注射 APAP 后 0、2、6 h 时肝组织中 p-AMPK 相对表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。腹腔注射 APAP 后 0、2、6 h 时 2 组小鼠肝组织中 AMPK 相对表达量比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。APAP + DHA 组 HepaRG 细胞处理 3、6 h 时 p-AMPK 相对表达量显著高于 APAP + DMSO 组($P < 0.05$),APAP + DHA 组和 APAP + DMSO 组 HepaRG 细胞处理 3、6 h 时 p-AMPK 相对表达量显著低于 0 h 时($P < 0.05$);APAP + DHA 组和 APAP + DMSO 组 HepaRG 细胞处理 0、3、6 h 时 AMPK 相对表达量比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。APAP + DMSO 组、APAP + DHA 组 HepaRG 细胞凋亡率均显著高于 PBS + DMSO 组和 PBS + DHA 组($P < 0.05$),APAP + DHA 组 HepaRG 细胞凋亡率显著低于 APAP + DMSO 组($P < 0.05$),PBS + DMSO 组与 PBS + DHA 组 HepaRG 细胞凋亡率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** ω -3PUFA 对 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤有保护作用,其机制可能与 ω -3PUFA 促进 AMPK 通路活化有关。

关键词: 多不饱和脂肪酸;对乙酰氨基酚;急性肝损伤;腺苷酸活化蛋白激酶

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2019)06-0506-06

Protective effects of ω -3 polyunsaturated fatty acids on acute liver injury induced by acetaminophen in mice

TAO Tao¹, ZHOU Quan¹, ZHOU Jia²

(1. Department of Anesthesiology, Central People's Hospital of Zhanjiang, Zhanjiang 524045, Guangdong Province, China; 2. Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect and mechanism of ω -3 polyunsaturated fatty acid (ω -3

DOI:10.7683/xyxyxb.2019.06.002

收稿日期:2018-11-16

作者简介:陶涛(1978-),男,安徽芜湖人,博士,副主任医师,研究方向:围术期肝保护。

PUFA) on acute liver injury induced by acetaminophen (APAP) in mice. **Methods** Twenty-four healthy *C57BL/6* female wild-type mice (WT group) and 24 Fat-1 transgenic female mice (Fat-1 group) were selected as subjects. The acute liver injury model of mice was established by intraperitoneal injection of APAP. At 0, 2, 6 and 24 hours after intraperitoneal injection of APAP, six mice in each group were executed by CO₂ method, and the liver tissues and venous blood were collected for subsequent experiments. The level of serum alanine aminotransferase (ALT) of the mice was detected by ALT kit, The morphological change of liver tissues of the mice was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and the expression of adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) and phosphorylated AMPK (p-AMPK) in liver tissues of the mice was detected by Western blot method. HepaRG cells were incubated with APAP for 6 hours to induce apoptosis. The HepaRG cells were divided into APAP + docosahexenoic acid (DHA) group and APAP + dimethyl sulfoxide (DMSO) group. DHA was added into nutrient medium in APAP + DHA group and DMSO was added into nutrient medium in APAP + DMSO group. HepaRG cells were collected at 0, 3 and 6 h of treatment, and the expressions of AMPK and p-AMPK in HepaRG cells were detected by Western blot method. HepaRG cells were randomly divided into phosphate buffered saline (PBS) + DHA group, PBS + DMSO group, APAP + DHA group and APAP + DMSO group. The HepaRG cells in APAP + DHA group and APAP + DMSO group were incubated with APAP for 6 hours to induce apoptosis, and PBS was added in PBS + DHA group and PBS + DMSO group. After changing the medium, DHA was added into nutrient medium in APAP + DHA group and PBS + DHA group, DMSO was added into nutrient medium in APAP + DMSO group and PBS + DMSO group. The cells in each group were collected after incubation in incubator for 6 hours, and the apoptosis of HepaRG cells was detected by flow cytometry. **Results**

The level of serum ALT of mice at 2, 6 and 24 hours after intraperitoneal injection of APAP was significantly higher than that at 0 hour in the two groups ($P < 0.05$). The level of serum ALT of mice in the Fat-1 group was significantly lower than that in the WT group at 2, 6 and 24 hours after intraperitoneal injection of APAP ($P < 0.05$). Twenty-four hours after APAP injection, the HE staining showed that the hepatocytes of mice in the WT group showed varying degrees of degeneration or necrosis, nucleus dissolution or pyknosis; normal morphology of liver cell cord was destroyed with obvious inflammatory cell infiltration; while the liver tissue lesions of mice in the Fat-1 group were milder. The relative expression of p-AMPK in liver tissues of mice in the Fat-1 group was significantly higher than that in the WT group at 2 and 6 hours after intraperitoneal injection of APAP ($P < 0.05$). The relative expression of p-AMPK in liver tissues of mice at 2 and 6 hours after intraperitoneal injection of APAP was significantly lower than that at 0 hour in WT group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the relative expression of p-AMPK in liver tissues of mice at 0, 2 and 6 hours after intraperitoneal injection of APAP in the Fat-1 group ($P > 0.05$). There was no significant difference in the relative expression of AMPK between the two groups at 0, 2 and 6 hours after intraperitoneal injection of APAP ($P > 0.05$). The relative expression of p-AMPK in HepaRG cells of the APAP + DHA group was significantly higher than that of the APAP + DMSO group at 3 and 6 hours of intervention ($P < 0.05$), the relative expression of p-AMPK in HepaRG cells at 3 and 6 hours was significantly lower than that at 0 hour in the two groups ($P < 0.05$), but there was no significant difference in the relative expression of AMPK between the two groups at 0, 3 and 6 hours ($P > 0.05$). The apoptotic rate of HepaRG cells in the APAP + DMSO group and the APAP + DHA group was significantly higher than that in the PBS + DMSO group and the PBS + DHA group ($P < 0.05$). The apoptotic rate of HepaRG cells in the APAP + DHA group was significantly lower than that in the APAP + DMSO group ($P < 0.05$). There was no significant difference in apoptotic rate of HepaRG cells between the PBS + DMSO group and the PBS + DHA group ($P > 0.05$).

Conclusion ω-3PUFA has protective effect on acute liver injury induced by APAP in mice, and its mechanism may be related to ω-3PUFA promoting the activation of AMPK pathway.

Key words: polyunsaturated fatty acid; acetaminophen; acute liver injury; adenosine monophosphate activated protein kinase

对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 是一种广泛使用的解热镇痛药, 过量服用会使肝内代谢产物堆积, 直接损伤肝细胞, 进而导致严重的急性肝损伤, 约 48% 的急性肝损伤由 APAP 过量摄入引起^[1]。研究显示, 腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK) 通路激活对保护 APAP 诱导的肝损伤起关键作用^[2-3]。

ω-3 多不饱和脂肪酸 (ω-3 polyunsaturated fatty acid, ω-3PUFA) 是第 1 个不饱和键出现在碳链甲基端第 3 位的 PUFA, 主要包含二十二碳六烯酸 (docosahexenoic acid, DHA) 和二十碳五烯酸 (eicosapentenoic acid, EPA)^[4]。研究显示, ω-3PUFA 在多个肝脏疾病模型中发挥保护作用, 且具有活化 AMPK 通路的功能^[5-7]。本研究使用能够自身合成

ω -3PUFA的 Fat-1 转基因小鼠,探讨 ω -3PUFA 对 APAP 诱导的急性肝损伤的保护作用及其对 AMPK 通路的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 无特定病原体级健康 C57BL/6 雌性野生型 (wide type, WT) 小鼠 24 只 (WT 组) 由南方医科大学医学实验动物中心提供,8 周龄,体质量 22 ~ 25 (23.47 ± 1.01) g; Fat-1 转基因雌性小鼠 24 只 (Fat-1 组) 由南方医科大学基础医学院周嘉惠赠,8 周龄,体质量 20 ~ 25 (23.13 ± 1.45) g; 2 组小鼠饲养 8 周,饲养温度 (23 ± 2) °C,自然通风,明暗周期 12 h/12 h,自由摄食、饮水。

1.2 细胞、试剂与仪器 HepaRG 细胞 (中国科学院上海细胞库), APAP (美国 Santa Cruz 公司), 1640 细胞培养基、胎牛血清、二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司], 丙氨酸氨基转移酶 (alanine transaminase, ALT) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所), 蛋白裂解液和二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), 异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白 V/碘化丙啶 (annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide, Annexin V-FITC/PI) 细胞凋亡检测试剂盒 (浙江联科生物技术有限公司)。Western blot 和凝胶成像设备 (美国 Bio-Rad 公司), 双激光流式细胞仪 (美国 BD 公司), 组织自动脱水机、恒温摊烤片机、石蜡切片机 (德国徕卡公司), 显微镜及其拍照系统 (日本 Olympus 公司)。

1.3 急性肝损伤小鼠模型制备 参照文献 [8] 方法制备急性肝损伤小鼠模型。WT 组和 Fat-1 组小鼠均腹腔注射 APAP 400 mg · kg⁻¹; 分别于腹腔注射后 0、2、6、24 h 应用 CO₂ 法每组处死 6 只小鼠, 采集小鼠肝组织和静脉血, 用于后续实验。

1.4 小鼠血清 ALT 水平检测 应用 ALT 检测试剂盒检测小鼠血清 ALT 水平, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.5 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察小鼠肝组织形态学变化 取腹腔注射后 24 h 处死小鼠的肝组织, 40 g · L⁻¹ 多聚甲醛固定 48 h, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 5 μm 切片, 通过烤片、脱蜡、水化后, 苏木精染色 5 min, 蒸馏水返蓝 1 min, 伊红染色 1 min, 然后脱水、透明、封片, 显微镜下观察并拍照。

1.6 Western blot 法检测肝组织中 AMPK 和磷酸化 AMPK (phosphorylated AMPK, p-AMPK) 水平

称取 2 组小鼠腹腔注射 APAP 后 0、2、6 h 获取的新鲜肝组织 100 mg, 于蛋白裂解液中充分裂解后离心取上清液, 变性制备蛋白样品; 将 2 组样品分别等质量加样至泳道, 电泳后转膜至聚偏氟乙烯膜, 200 mA 冰浴 120 min; 50 g · L⁻¹ 牛血清白蛋白室温封闭 60 min 后置于水平摇床, 加入 AMPK、p-AMPK 和磷酸甘油醛脱氢酶 (reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 一抗, 4 °C 孵育过夜; 加入二抗孵育 45 min; 加入发光液在暗室曝光, 经显影、定影后将胶片扫描至电脑, 应用 ImageJ 软件获取条带的吸光度值进行定量分析。

1.7 Western blot 法检测 HepaRG 细胞中 AMPK 和 p-AMPK 表达 取 HepaRG 细胞, 使用含体积分数 10% 胎牛血清的 1640 完全培养基培养, 置于 37 °C、含体积分数 5% CO₂ 的饱和湿度恒温细胞培养箱中。应用 20 mmol APAP 孵育 6 h 诱导 HepaRG 细胞凋亡, 换培养基后将细胞分为 APAP + DHA 组和 APAP + DMSO 组, APAP + DHA 组在培养基中加入 50 μmol DHA, APAP + DMSO 组在培养基中加入 DMSO, 使其最终体积分数为 1%; 继续温箱孵育, 分别于处理 0、3、6 h 时收集大于 1 × 10⁶ 个 HepaRG 细胞裂解制备蛋白样品, 采用 Western blot 法检测 HepaRG 细胞中 AMPK 和 p-AMPK 表达, 操作步骤同“1.6”项; 实验重复 3 次。

1.8 流式细胞术检测 HepaRG 细胞凋亡情况 取 HepaRG 细胞并随机分为 PBS + DHA 组、PBS + DMSO 组、APAP + DHA 组和 APAP + DMSO 组, APAP + DHA 组和 APAP + DMSO 组细胞加入 20 mmol APAP 孵育 6 h 诱导 HepaRG 细胞凋亡, PBS + DHA 组和 PBS + DMSO 组细胞加入 PBS, 换培养基后, APAP + DHA 组和 PBS + DHA 组在培养基中加入 50 μmol DHA, APAP + DMSO 组和 PBS + DMSO 组在培养基中加入 DMSO, 使其最终体积分数为 1%; 各组细胞继续温箱孵育 6 h, 收集细胞, 应用 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒检测 HepaRG 细胞凋亡率, 严格按照试剂盒说明书进行操作; 实验重复 3 次。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两两比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组小鼠血清 ALT 水平比较 结果见表 1。腹腔注射 APAP 后 0 h 时 2 组小鼠血清 ALT 水平比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05); 2 组小鼠腹腔注射

APAP后2、6、24 h时血清ALT水平显著高于0 h时,差异有统计学意义($P < 0.05$);腹腔注射APAP后2、6、24 h时,Fat-1组小鼠血清ALT水平显著低于WT组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

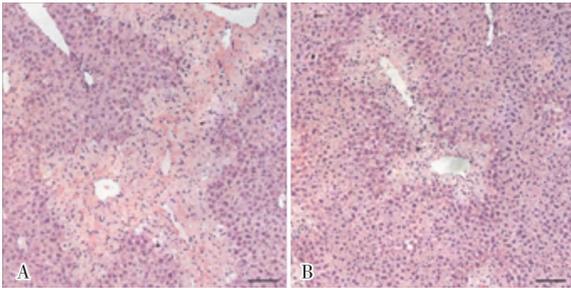
表1 2组小鼠血清ALT水平比较

Tab.1 Comparison of the level of serum ALT of mice between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT/(U·L ⁻¹)			
		0 h	2 h	6 h	24 h
WT组	6	65.86 ± 6.19	313.30 ± 26.12 ^a	943.00 ± 37.67 ^a	424.20 ± 14.64 ^a
Fat-1组	6	71.86 ± 2.53	247.40 ± 25.25 ^{ab}	431.80 ± 6.10 ^{ab}	244.80 ± 12.60 ^{ab}

注:与0 h时比较^a $P < 0.05$;与WT组比较^b $P < 0.05$ 。

2.2 2组小鼠肝组织形态学变化 结果见图1。HE染色结果显示,WT组小鼠肝细胞呈现不同程度的变性或坏死,细胞核溶解或固缩,肝细胞索正常形态被破坏并伴有明显的炎性细胞浸润;而Fat-1组小鼠肝脏组织病变较轻。



A: WT组; B: Fat-1组。

图1 2组小鼠肝组织形态学变化(HE染色, ×100)

Fig.1 Morphological changes of liver tissues of mice in the two groups(HE staining, ×100)

表2 2组小鼠肝组织中AMPK及p-AMPK表达比较

Tab.2 Comparison of the expression of AMPK and p-AMPK in liver tissues of mice between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AMPK			p-AMPK		
		0 h	2 h	6 h	0 h	2 h	6 h
WT组	6	1.20 ± 0.14	1.14 ± 0.06	1.14 ± 0.06	0.76 ± 0.07	0.38 ± 0.06 ^a	0.12 ± 0.04 ^a
Fat-1组	6	1.18 ± 0.10	1.18 ± 0.04	1.16 ± 0.07	0.72 ± 0.12	0.88 ± 0.05 ^b	0.80 ± 0.12 ^b

注:与0 h时比较^a $P < 0.05$;与WT组比较^b $P < 0.05$ 。

2.4 DHA对APAP诱导的HepaRG细胞中AMPK磷酸化的影响 结果见表3和图3。处理0 h时2组HepaRG细胞中p-AMPK相对表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$);处理3、6 h时,APAP+DHA组HepaRG细胞中p-AMPK相对表达量显著高于APAP+DMSO组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表3 2组HepaRG细胞中AMPK和p-AMPK表达比较

Tab.3 Comparison of the expression of AMPK and p-AMPK in HepaRG cells between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AMPK			p-AMPK		
		0 h	3 h	6 h	0 h	3 h	6 h
APAP+DMSO组	3	1.94 ± 0.07	2.03 ± 0.09	1.96 ± 0.15	1.05 ± 0.07	0.31 ± 0.07 ^a	0.08 ± 0.03 ^a
APAP+DHA组	3	1.97 ± 0.16	2.06 ± 0.16	2.03 ± 0.08	1.02 ± 0.09	0.56 ± 0.05 ^{ab}	0.27 ± 0.06 ^{ab}

注:与0 h时比较^a $P < 0.05$;与APAP+DMSO组比较^b $P < 0.05$ 。

2.3 2组小鼠肝组织中AMPK及p-AMPK相对表达量比较 结果见图2和表2。腹腔注射APAP后0 h时2组小鼠肝组织中p-AMPK相对表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$);腹腔注射APAP后2、6 h时Fat-1组小鼠肝组织中p-AMPK相对表达量显著高于WT组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。WT组小鼠腹腔注射APAP后2、6 h时肝组织中p-AMPK相对表达量显著低于0 h时,差异有统计学意义($P < 0.05$);Fat-1组小鼠腹腔注射APAP后0、2、6 h时肝组织中p-AMPK相对表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。腹腔注射APAP后0、2、6 h时2组小鼠肝组织中AMPK相对表达量比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

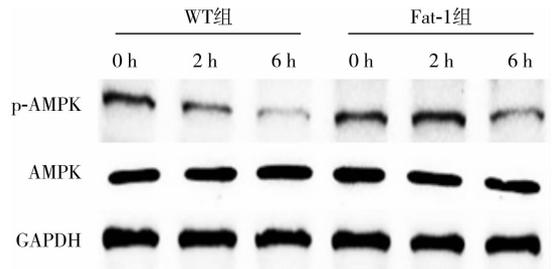


图2 2组小鼠肝组织中AMPK和p-AMPK表达(Western blot)

Fig.2 Expression of AMPK and p-AMPK in liver tissues of mice in the two groups (Western blot)

0.05)。APAP+DHA组和APAP+DMSO组HepaRG细胞处理3、6 h时p-AMPK相对表达量显著低于0 h时,差异有统计学意义($P < 0.05$);APAP+DHA组和APAP+DMSO组HepaRG细胞处理0、3、6 h时AMPK相对表达量比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

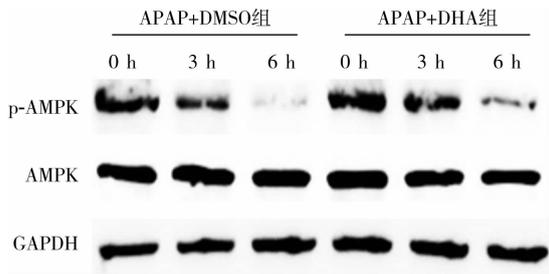


图3 2组 HepaRG 细胞中 AMPK 和 p-AMPK 表达 (Western blot)

Fig.3 Expression of AMPK and p-AMPK in HepaRG cells of the two groups(Western blot)

2.5 DHA 对 APAP 诱导 HepaRG 细胞凋亡的影响

结果见表4。APAP + DMSO 组、APAP + DHA 组 HepaRG 细胞凋亡率均显著高于 PBS + DMSO 组和 PBS + DHA 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); APAP + DHA 组 HepaRG 细胞凋亡率显著低于 APAP + DMSO 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); PBS + DMSO 组与 PBS + DHA 组 HepaRG 细胞凋亡率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表4 4组 HepaRG 细胞凋亡率比较

Tab.4 Comparison of apoptotic rate of HepaRG cells among the four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞凋亡率/%
PBS + DMSO 组	3	1.91 ± 0.11
PBS + DHA 组	3	1.89 ± 0.08
APAP + DMSO 组	3	6.91 ± 0.11 ^{ab}
APAP + DHA 组	3	4.03 ± 0.09 ^{abc}

注:与 PBS + DMSO 组比较^a $P < 0.05$;与 PBS + DHA 组比较^b $P < 0.05$;与 APAP + DMSO 组比较^c $P < 0.05$ 。

3 讨论

肝脏是药物代谢的主要场所,药物性肝损伤是指由于药物及其代谢产物的毒性损害或过敏反应而产生的肝脏损伤^[9]。APAP 过量摄入是临床发生药物代谢性肝损伤的主要原因,寻找缓解 APAP 毒性的方法非常重要。 ω -3PUFA 是第 1 个不饱和键出现在碳链甲基端第 3 位的 PUFA,主要包含 DHA 和 EPA。 ω -3PUFA 具有免疫调节和抗炎的特性,可以通过增加抗氧化酶的能力从而减少过氧化物酶的产生。研究证明, ω -3PUFA 在肝硬化、心血管疾病和神经退行性疾病的预防及治疗中具有重要作用^[10-12]。Fat-1 基因的编码产物是 ω -3 脂肪酸脱氢酶,其能够使 ω -6PUFA 脱氢转化为 ω -3PUFA, KANG 等^[13]以 C57BL/6 小鼠为背景成功建立了 Fat-1 转基因小鼠, Fat-1 转基因小鼠自身能够合成 ω -3PUFA。因此,本研究采用 Fat-1 转基因小鼠和其野生型 C57BL/6 小鼠作为研究动物,利用 Western blot、HE 染色和流式细胞术等方法,探究 ω -3PUFA 对 APAP 诱导的急性

肝损伤的保护作用及可能机制。

本研究结果显示,小鼠腹腔注射 APAP 后 24 h WT 组小鼠肝细胞呈现不同程度的变形或坏死,而 Fat-1 组小鼠肝脏病变较轻;且 2 组小鼠腹腔注射 APAP 后 2、6、24 h 时血清 ALT 水平显著高于 0 h 时,同时 Fat-1 组小鼠血清 ALT 水平显著低于 WT 组;另外,体外细胞研究显示,APAP + DMSO 组和 APAP + DHA 组 HepaRG 细胞凋亡率显著高于 PBS + DMSO 组和 PBS + DHA 组, APAP + DHA 组 HepaRG 细胞凋亡率显著低于 APAP + DMSO 组, PBS + DMSO 组与 PBS + DHA 组 HepaRG 细胞凋亡率比较差异无统计学意义;提示 APAP 腹腔注射能够诱导小鼠急性肝损伤,而 ω -3PUFA 能够缓解小鼠由 APAP 所致的急性肝损伤。

AMPK 通路的活化被认为在 APAP 诱导的急性肝损伤中发挥保护作用,其主要作用机制为稳定肝细胞的线粒体膜电位、促进线粒体融合以维持线粒体功能^[14],抵抗经肝细胞内细胞色素 P450 家族成员 CYP2E1、CYP1A2 及 CYP3A4 代谢 APAP 产生的代谢产物堆积导致的氧化应激损伤^[15]。有研究显示, ω -3PUFA 可促进非小细胞肺癌细胞中 AMPK 磷酸化,从而导致肿瘤细胞凋亡,且 AMPK 通路的活化可以增强胰岛素抵抗的作用,缓解内质网应激造成的急性损伤^[16]。还有研究表明, ω -3PUFA 能够减轻 LPS 所致脑损伤新生大鼠海马组织中的氧化应激反应,减少海马组织细胞凋亡^[17]。因此,作者推测 ω -3PUFA 对 APAP 造成的肝损伤的保护作用也是通过 AMPK 信号通路激活而实现的。本研究结果显示,腹腔注射 APAP 后 2、6 h 时 Fat-1 组小鼠肝组织中 p-AMPK 相对表达量显著高于 WT 组,WT 组小鼠腹腔注射 APAP 后 2、6 h 时肝组织中 p-AMPK 相对表达量显著低于 0 h 时,而 Fat-1 组小鼠腹腔注射 APAP 后 0、2、6 h 时肝组织中 p-AMPK 相对表达量比较差异无统计学意义;另外,体外细胞研究显示,处理 3、6 h 时,APAP + DHA 组 HepaRG 细胞中 p-AMPK 相对表达量显著高于 APAP + DMSO 组;提示 ω -3PUFA 可能通过促进 AMPK 信号通路活化而保护 APAP 诱导的急性肝损伤。

综上所述, ω -3PUFA 对 APAP 诱导的急性肝损伤有保护作用,其机制可能与 ω -3PUFA 促进 AMPK 通路活化有关。 ω -3PUFA 的主要成分 DHA 有可能作为临床营养剂而用于 APAP 诱导肝损伤的防治。

参考文献:

[1] JAESCHKE H. Acetaminophen; dose-dependent drug hepatotoxicity and acute liver failure in patients[J]. *Dig Dis*, 2015, 33(4): 464-471.

参考文献:

- [1] LI K, WEI Q, LIU F F, et al. Synaptic dysfunction in Alzheimer's disease: A β , Tau, and epigenetic alterations [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(4): 3021-3032.
- [2] FAWVER J N, SCHALL H E, PETROFES C R D, et al. Amyloid- β metabolite sensing: biochemical linking of glycation modification and misfolding [J]. *J Alzheimers Dis*, 2012, 30(1): 63-73.
- [3] DRENTH H, ZUIDENA S U, KRUIJEN W P, et al. Association between advanced glycation end-products and functional performance in Alzheimer's disease and mixed dementia [J]. *Int Psychogeriatr*, 2017, 29(9): 1525-1534.
- [4] ZHANG J, GUO Y, WANG Y, et al. Long-term treadmill exercise attenuates A β burdens and astrocyte activation in APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 666: 70-77.
- [5] TAKUMA K, FANG F, ZHANG W, et al. RAGE-mediated signaling contributes to intraneuronal transport of amyloid-beta and neuronal dysfunction [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(47): 20021-20026.
- [6] CHEN C, LI X H, TU Y, et al. A β -AGE aggravates cognitive deficit in rats via RAGE pathway [J]. *Neuroscience*, 2014, 257: 1-10.
- [7] FREDERIKSEN K S, GJERUM L, WALDEMAR G, et al. Effects of physical exercise on Alzheimer's disease biomarkers: a systematic review of intervention studies [J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 61(1): 359-372.
- [8] 王晓燕. 血清胱抑素 C、 β 2-微球蛋白、视黄醇结合蛋白、尿微量白蛋白及 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶在诊断糖尿病早期肾损伤中的临床意义 [J]. *新乡医学院学报*, 2017, 34(2): 143-146.
- [9] TSUTSUI Y, HAYS F A. A link between Alzheimer's and type II diabetes mellitus? Ca²⁺-mediated signal control and protein localization [J]. *Bioessays*, 2018, 40(6): e1700219.
- [10] KAMYNINA A V, ESTERAS N, KOROEV D O, et al. Synthetic fragments of receptor for advanced glycation end products bind beta-amyloid 1-40 and protect primary brain cells from beta-amyloid toxicity [J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 681.
- [11] 张英博, 费洪新, 郭家, 等. 蝙蝠葛碱对阿尔茨海默病小鼠海马晚期糖基化终产物受体和核转录因子- κ Bp65 的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(19): 4697-4700.
- [12] VOLPINA O M, SAMOKHIN A N, KOROEV D O, et al. Synthetic fragment of receptor for advanced glycation end products prevents memory loss and protects brain neurons in olfactory bulbectomized mice [J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 61(3): 1061-1076.
- [13] LI X H, DU L L, CHENG X S, et al. Glycation exacerbates the neuronal toxicity of β -amyloid [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e673.
- [14] STEUCHER E, GALICHET A, WEIBEL M, et al. Site-specific blockade of RAGE-Vd prevents amyloid-beta oligomer neurotoxicity [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(20): 5149-5158.
- [15] CAI Z, LIU N, WANG C, et al. Role of RAGE in Alzheimer's disease [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36(4): 483-495.
- [16] CHEN W, CHAN Y, WAN W, et al. A β ₁₋₄₂ induces cell damage via RAGE-dependent endoplasmic reticulum stress in bEnd.3 cells [J]. *Exp Cell Res*, 2018, 362(1): 83-89.
- (本文编辑:李胜利 英文编辑:孟月)
- (上接第 510 页)
- [2] WANG L, ZHANG S, CHENG H, et al. Nrf2-mediated liver protection by esculentoside A against acetaminophen toxicity through the AMPK/Akt/GSK3 β pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 101(3): 401-412.
- [3] ZHENG L, YIN L, XU L, et al. Protective effect of dioscin against thioacetamide-induced acute liver injury via FXR/AMPK signaling pathway *in vivo* [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 97: 481-488.
- [4] 石计朋, 孙亚洲, 栗延伟, 等. ω -3 多不饱和脂肪酸和 ω -6 多不饱和脂肪酸对脂多糖致脑损伤新生大鼠 Toll 样受体 4/核因子- κ B 信号通路及炎症因子的影响 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2018, 33(12): 918-922.
- [5] LI Y, TANG Y, WANG S, et al. Endogenous n-3 polyunsaturated fatty acids attenuate T cell-mediated hepatitis via autophagy activation [J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 350.
- [6] YANG W, CHEN X, CHEN M, et al. Fish oil supplementation inhibits endoplasmic reticulum stress and improves insulin resistance; involvement of AMP-activated protein kinase [J]. *Food Funct*, 2017, 8(4): 1481-1493.
- [7] NAKAMOTO K, SHIMADA K, HARADA S, et al. DHA supplementation prevent the progression of NASH via GPR120 signaling [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 820: 31-38.
- [8] CHEN D, NI H M, WANG L, et al. p53 up-regulated modulator of apoptosis induction mediates acetaminophen-induced necrosis and liver injury in mice [J]. *Hepatology*, 2019, 69(5): 2164-2179.
- [9] 徐礼通, 陈松海, 李忠斌, 等. 肝活检确诊药物性肝损害的病因及临床特征分析 [J]. *解放军医学杂志*, 2018, 43(2): 130-134.
- [10] YANG J, FERNANDEZ-GALILEA M, MARTINEZ-FERNANDEZ L, et al. Oxidative stress and non-alcoholic fatty liver disease: effects of omega-3 fatty acid supplementation [J]. *Nutrients*, 2019, 11(4): 872.
- [11] SISCOVICK D S, BARRINGER T A, FRETTS A M, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid (fish oil) supplementation and the prevention of clinical cardiovascular disease [J]. *Circulation*, 2017, 135(15): e867-e884.
- [12] 陈则华, 胡慧芸, 陈鹰, 等. ω -3 多不饱和脂肪酸调节血脂及抗动脉粥样硬化作用机制研究进展 [J]. *医药导报*, 2018, 37(11): 1334-1338.
- [13] KANG J X, WANG J, WU L, et al. Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids [J]. *Nature*, 2004, 427(6974): 504.
- [14] KANG S W, HAYDAR G, TANIANE C, et al. AMPK activation prevents and reverses drug-induced mitochondrial and hepatocyte injury by promoting mitochondrial fusion and function [J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e165638.
- [15] FAN X, LV H, WANG L, et al. Isoorientin ameliorates APAP-induced hepatotoxicity via activation Nrf2 antioxidative pathway: the involvement of AMPK/Akt/GSK3 β [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1334.
- [16] KIM N, JEONG S, JING K, et al. Docosahexaenoic acid induces cell death in human non-small cell lung cancer cells by repressing mTOR via AMPK activation and PI3K/Akt inhibition [J]. *Bio Med Res Int*, 2015, 2015(2): 239764.
- [17] 石计朋, 栗延伟, 郭丽娟, 等. ω -3 多不饱和脂肪酸对脂多糖所致脑损伤新生大鼠海马组织中氧化应激产物和细胞凋亡的影响 [J]. *新乡医学院学报*, 2018, 35(6): 455-458.
- (本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超)