

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research没食子酸调节 AMPK/ACC 信号通路对
自身免疫性肝炎小鼠肝组织损伤的研究Research of Gallic acid on liver tissue damage in autoimmune hepatitis mice by
adjusting the AMPK/ACC signaling pathway李高波^{1a}, 王 婷^{1b}, 霍昱章²,
阿迪莱^{1a}, 宋永蓉^{1a}, 吕健宏^{1a},
张煜华^{1a}(1. 新疆医科大学 第二附属医院 a. 感染疾病
科; b. 肾病科, 新疆维吾尔自治区 乌鲁木
齐 830063; 2. 新疆医科大学 第七附属医院 超声诊
断科, 新疆维吾尔自治区 乌鲁木
齐 830028)LI Gao-bo^{1a}, WANG Ting^{1b},
HUO Yu-zhang², ADILAI^{1a},
SONG Yong-rong^{1a},
LÜ Jian-hong^{1a},
ZHANG Yu-hua^{1a}(1. a. Department of Infectious Diseases;
b. Department of Nephrology, The Second
Affiliated Hospital of Xinjiang Medical
University, Urumqi 830063, Xinjiang
Uyghur Autonomous Region, China; 2.
Department of Ultrasonic Diagnosis, The
Seventh Affiliated Hospital of Xinjiang
Medical University, Urumqi 830028,
Xinjiang Uyghur Autonomous Region,
China)基金项目: 新疆维吾尔自治区科技计划基金资
助项目(2024D01C152)作者简介: 李高波(1980-), 男, 主治医师, 主要
从事感染疾病相关的工作和研究

通信作者: 王婷, 主任医师

MP: 15299103631

E-mail: 1577749733@qq.com

摘要:目的 探讨没食子酸调节腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/乙酰辅酶A羧化酶(ACC)信号通路对自身免疫性肝炎(AIH)小鼠肝组织损伤的影响。方法 通过尾静脉注射 $15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 刀豆蛋白A构建AIH小鼠模型,随机分为模型组、低剂量实验组($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、高剂量实验组($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组、AMPK抑制剂组($5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组和没食子酸+AMPK抑制剂组,并以等体积的磷酸缓冲液处理的正常小鼠为对照组。干预结束后,自动生化分析仪分析谷丙转氨酶(GPT)等水平,用酶联免疫吸附测定法(ELISA)法检测肝匀浆中丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)水平,血清上清液中白细胞介素(IL)-10、IL-6和肿瘤坏死因子(TNF- α)水平;用苏木精-伊红(HE)法检测组织病理学变化;用末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记(TUNEL)法检测细胞凋亡情况;用蛋白质印迹法检测磷酸化(p-AMPK/AMPK、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、B细胞淋巴瘤/白血病-2蛋白(Bcl-2)和ACC蛋白相对表达水平。结果 对照组、模型组、低剂量实验组、高剂量实验组、AMPK抑制剂组和高剂量实验+AMPK抑制剂组谷草转氨酶(GOT)分别为(82.05 ± 8.31)、(210.20 ± 21.14)、(135.26 ± 14.64)、(91.02 ± 9.21)、(308.15 ± 30.85)和(129.84 ± 13.08) $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$, GPT分别为(50.23 ± 5.11)、(324.85 ± 33.25)、(152.34 ± 15.48)、(88.64 ± 8.95)、(482.62 ± 50.02)和(148.85 ± 15.02) $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$, TNF- α 分别为(41.06 ± 4.37)、(149.85 ± 15.28)、(88.39 ± 8.97)、(51.06 ± 5.21)、(267.85 ± 27.18)和(154.62 ± 15.68) $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, IL-6分别为(48.42 ± 4.92)、(134.52 ± 13.58)、(75.42 ± 7.61)、(57.85 ± 5.81)、(215.84 ± 21.98)和(78.62 ± 7.98) $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, IL-10分别为(486.52 ± 49.02)、(188.72 ± 19.08)、(318.54 ± 32.08)、(445.67 ± 45.11)、(114.21 ± 11.94)和(324.15 ± 32.67) $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, SOD分别为(48.26 ± 4.99)、(19.52 ± 2.11)、(32.25 ± 3.44)、(44.21 ± 4.57)、(11.37 ± 1.21)和(31.24 ± 3.22) $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$, MDA分别为(0.28 ± 0.03)、(0.84 ± 0.09)、(0.56 ± 0.06)、(0.31 ± 0.04)、(1.31 ± 0.15)和(0.64 ± 0.07) $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$, 组织病理评分分别为 0 、 2.64 ± 0.27 、 2.27 ± 0.24 、 1.22 ± 0.14 、 3.54 ± 0.36 和 2.19 ± 0.23 , 凋亡率分别为(5.24 ± 0.54)%、(23.62 ± 2.44)%、(16.42 ± 1.72)%、(8.52 ± 0.89)%、(34.85 ± 3.61)%和(17.06 ± 1.75)%, 模型组的上述指标与对照组比较、低、高剂量实验组的上述指标与模型组比较及高剂量实验+AMPK抑制剂组的上述指标与高剂量实验组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论 没食子酸可以抑制AIH小鼠炎症反应及氧化应激水平,减少细胞凋亡,改善肝功能,减轻肝组织病理损伤,下调Bax和ACC表达,上调p-AMPK/AMPK和Bcl-2表达,AMPK抑制剂逆转了高剂量没食子酸对AIH小鼠的保护作用。没食子酸激活AMPK/ACC信号通路减轻AIH小鼠肝组织损伤。

关键词: 没食子酸; 自身免疫性肝炎; 腺苷酸活化蛋白激酶/乙酰辅酶A羧化酶信号通路; 肝组织

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.21.010

中图分类号: R28 文献标志码: A
文章编号: 1001-6821(2025)21-3054-07

Abstract: Objective To explore the effect of Gallic acid on liver tissue damage in autoimmune hepatitis (AIH) mice by adjusting adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) / acetyl-coa carboxylase (ACC) signaling pathway. **Methods** An AIH mouse model was established by injecting $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ concanavalin A through the tail vein. The mice were randomly divided into model group, low-dose experimental group ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), high-dose experimental group ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), AMPK inhibitor group ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), gallic acid + AMPK inhibitor group and normal mice group with the same volume of phosphate-buffered solution as control group. After the intervention, the automatic biochemical analyzer was used to analyze glutamic pyruvic transaminase (GPT), the levels of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in liver homogenate were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the levels of interleukin (IL)-10, IL-6 and tumor necrosis factor (TNF- α) in serum supernatant were also measured. The histopathological changes were detected by the hematoxylin-eosin (HE) staining method; the apoptosis status was examined by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method. The relative expression levels of phosphorylated (p-) AMPK/AMPK, Bcl-2 related X protein (Bax), B-cell lymphoma/leukemia-2 protein (Bcl-2) and ACC protein were detected by Western blotting. **Results** The glutamic-oxalacetic transaminase (GOT) levels in control group, model group, low-dose experimental group, high-dose experimental group, AMPK inhibitor group and high-dose experimental + AMPK inhibitor group were (82.05 ± 8.31), (210.20 ± 21.14), (135.26 ± 14.64), (91.02 ± 9.21), (308.15 ± 30.85) and (129.84 ± 13.08) $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; the GPT levels were (50.23 ± 5.11), (324.85 ± 33.25), (152.34 ± 15.48), (88.64 ± 8.95), (482.62 ± 50.02) and (148.85 ± 15.02) $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; the TNF- α levels were (41.06 ± 4.37), (149.85 ± 15.28), (88.39 ± 8.97), (51.06 ± 5.21), (267.85 ± 27.18) and (154.62 ± 15.68) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the IL-6 levels were (48.42 ± 4.92), (134.52 ± 13.58), (75.42 ± 7.61), (57.85 ± 5.81), (215.84 ± 21.98) and (78.62 ± 7.98) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the IL-10 levels were (486.52 ± 49.02), (188.72 ± 19.08), (318.54 ± 32.08), (445.67 ± 45.11), (114.21 ± 11.94) and (324.15 ± 32.67) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the SOD levels were (48.26 ± 4.99), (19.52 ± 2.11), (32.25 ± 3.44), (44.21 ± 4.57), (11.37 ± 1.21) and (31.24 ± 3.22) $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectively; the MDA levels were (0.28 ± 0.03), (0.84 ± 0.09), (0.56 ± 0.06), (0.31 ± 0.04), (1.31 ± 0.15) and (0.64 ± 0.07) $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectively; the tissue pathological scores were 0, 2.64 ± 0.27 , 2.27 ± 0.24 , 1.22 ± 0.14 , 3.54 ± 0.36 and 2.19 ± 0.23 , respectively; the apoptosis rates were (5.24 ± 0.54)%, (23.62 ± 2.44)%, (16.42 ± 1.72)%, (8.52 ± 0.89)%, (34.85 ± 3.61)% and (17.06 ± 1.75)%, respectively. The above indexes of model group were compared with those of control group; low-dose and high-dose experimental group were compared with those of model group and high-dose experimental + AMPK inhibitor group were compared with those of high-dose experimental group, there were statistically significant differences (all $P < 0.05$). **Conclusion** Gallic acid can inhibit the inflammatory response and oxidative stress level in AIH mice, reduce cell apoptosis, improve liver function, alleviate liver tissue pathological damage, down-regulate Bax and ACC expression, up-regulate p-AMPK/AMPK and Bcl-2 expression; the AMPK inhibitor reverses the protective effect of high-dose gallic acid on AIH mice. Gallic acid activates the AMPK/ACC signaling pathway to alleviate liver tissue damage in AIH mice. **Key words:** gallic acid; autoimmune hepatitis; adenosine monophosphate-activated protein kinase/ acetyl-coa carboxylase signaling pathway; liver tissue

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)严重威胁人类健康,治疗不及时易进展为肝纤维化、肝硬化甚至肝癌,其常规治疗依赖免疫抑制药与糖皮质激素,但存在药物不良反应^[1],亟需探索高效安全的候

选治疗药物。刀豆蛋白A通常可以诱导免疫性肝损伤的类似特征,血浆中肝指标水平均显著升高,伴随中性粒细胞、巨噬细胞等炎性细胞浸润及释放,引发广泛肝坏死,且细胞凋亡与该肝炎发病机制密切相关

关^[2]。没食子酸是一种植物化学多酚,被证明具有保肝作用,如没食子酸是非酒精性脂肪性肝病发展进展为肝细胞癌的重要抑制因子,其机制与腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)/乙酰辅酶A羧化酶(acetyl-coa carboxylase, ACC)信号通路相关^[3]。AMPK作为细胞能量代谢受体,可调节肝葡萄糖、能量及脂质代谢,ACC作为脂肪酸合成限速酶,其活性受AMPK调控,参与肝脂质积累调节^[4]。本研究通过注射刀豆蛋白A建立AIH小鼠模型,旨在探讨没食子酸对AIH相关肝损伤的治疗作用,及是否通过调控AMPK/ACC信号通路发挥作用。

材料与方法

1 材料

实验动物 6~8周龄,体质量18~23 g雄性BALB/c小鼠,成都达硕实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(川)2020-030,使用许可证号:SYXK(川)2020-031。根据实验动物指南要求,将动物疼痛降至最低,使用特定无病原体设施饲养动物,并提供标准食物和水,小鼠适应新环境,温度为(23±2)℃,湿度为(50±5)%,光照/黑暗循环为12 h,超过1周即可进行实验。本实验经新疆医科大学第二附属医院医学伦理委员会批准(伦理批号:KY2024052109)

试剂 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)试剂盒,上海魔兜儿生物科技有限公司生产;磷酸化(phosphorylated, p-)AMPK、AMPK、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)、B细胞淋巴瘤/白血病-2蛋白(B-cell Lymphoma/Leukemia-2, Bcl-2)和ACC抗体,均由英国Abcam公司生产;AMPK抑制剂,纯度:99.91%,美国MedChemExpress公司生产;丙二醛(malondialdehyde, MDA)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),均由湖北艾美捷科技有限公司生产;白细胞介素(interleukin, IL)-10,上海吉泰依科赛生物科技有限公司生产;IL-6试剂盒,北京普利莱基因技术有限公司生产;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE),武汉赛维尔生物科技有限公司生产;没食子酸,纯度:≥98%,优利科(上海)生命科学有限公司生产;末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-End labeling, TUNEL)和3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB),均由美国Thermo

Fisher Scientific生产;放射免疫沉淀测定缓冲液(radio Immunoprecipitation assay buffer, RIPA),德国Sigma-Aldrich生产。

仪器 AU5800自动生化分析仪,美国Beckman Coulter产品;BX53显微镜,日本Olympus公司产品;Synergy H1多功能酶标仪,美国BioTek公司产品;Mini-PROTEAN® Tetra System垂直电泳仪、Mini Trans-Blot转膜仪,美国Bio-Rad(伯乐)公司产品。

2 方法

2.1 构建AIH小鼠模型^[5]

随机选取10只小鼠作为对照组,剩余小鼠构建AIH小鼠模型,建模方式:通过尾静脉注射15 mg·kg⁻¹刀豆蛋白A,12 h后随机选取2只小鼠进行肝组织病理损伤检查,建模成功的标志是肝组织病发生明显病变,对照组小鼠给予尾静脉注射等体积的磷酸缓冲液。

2.2 动物分组及处理方法

将造模成功的小鼠随机分为模型组、低剂量实验组、高剂量实验组、AMPK抑制剂组和高剂量实验+AMPK抑制剂组,每组10只,其中低、高剂量实验组以生理盐水为溶剂配制没食子酸工作液,灌胃50、100 mg·kg⁻¹没食子酸^[6];AMPK抑制剂组因Compound C在生理盐水中溶解度较低,先以少量二甲基亚砜助溶至完全溶解,再用生理盐水稀释配制成5 μmol·L⁻¹工作液(最终二甲基亚砜体积分数≤0.1%,经预实验验证无明显干预效应)以5 μmol·L⁻¹Compound C腹腔注射^[7];高剂量实验+AMPK抑制剂组灌胃100 mg·kg⁻¹没食子酸时,腹腔注射5 μmol·L⁻¹Compound C;其余组别均以生理盐水干预,每天1次,连续3周。

2.3 肝损伤指标评估^[8]

末次干预结束后,通过眼球取血,将血液以3 000 r·min⁻¹离心15 min,并将分离血清添加至自动生化分析仪中,分析谷丙转氨酶(glutamic pyruvic transaminase, GPT)指标。

2.4 酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测MDA、SOD、IL-6、IL-10和TNF- α 因子水平

将小鼠肝匀浆,用比色法检测MDA和SOD,用ELISA法检测血清上清液中IL-6、IL-10和TNF- α 水平;4℃将板用捕获抗体包被过夜,随后封闭板,将稀释样品在室温下孵育,检测抗体生物素化,随后添加TMB震荡混匀,终止反应,测量450 nm处光密度值。

2.5 HE 检测肝组织病理学变化^[9]

从所有小鼠中收集部分肝组织,固定、包埋在石蜡中,随后,对组织进行切片(4 μm),并用 HE 染色,以 400 $\times$ 的放大倍率采集图像,组织变化通过光学显微镜观察,其中炎症和坏死方面(0~4 分)评估肝病理生理学病变,4 分:重度($\geq 60\%$);3 分:中度($\leq 60\%$);2 分:轻度($\leq 30\%$);1 分:非常轻微;0 分:无。

2.6 TUNEL 法检测细胞坏死情况^[10]

通过脱蜡和再水化处理肝切片,用 TUNEL 反应溶液 50 μL 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下对肝组织切片染色,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)复染用于核染色,用荧光显微镜测定 TUNEL 阳性细胞表达。

2.7 蛋白质印迹法检测 p-AMPK、AMPK、Bax、Bcl-2 和 ACC 蛋白相对表达水平

收集肝组织并在 RIPA 缓冲液 100 μL 中匀浆,用样品缓冲液在 100 $^{\circ}\text{C}$ 下淬灭,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,用一抗(p-AMPK 稀释比例 1:1 000, AMPK 稀释比例 1:1 000, Bax 稀释比例 1:500, Bcl-2 稀释比例 1:1 000, ACC 稀释比例 1:1 000)和辣根过氧化物酶偶联二抗(稀释比例 1:2 000)进行蛋白质印迹,用 ChemiDoc 成像系统测定目标蛋白质表达。

3 统计学处理

用 SPSS 27.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据用单因素方差分析比较,两两比较用 *snk-q* 检验。

结 果

1 没食子酸对小鼠 GPT 和谷草转氨酶 (glutamic-oxalacetic transaminase, GOT) 的影响

模型组的 GPT 和 GOT 均显著高于对照组(均 $P < 0.05$);低、高剂量实验组的 GPT 和 GOT 均显著低于模型组(均 $P < 0.05$);AMPK 抑制剂组的 GPT 和 GOT 均显著高于模型组(均 $P < 0.05$);没食子酸-H + AMPK 抑制剂组的 GPT 和 GOT 均显著高于高剂量实验组(均 $P < 0.05$),但均显著低于 AMPK 抑制剂组(均 $P < 0.05$),见表 1。

2 没食子酸对小鼠 IL-6、IL-10 和 TNF- α 的影响

模型组的 IL-6 和 TNF- α 均显著高于对照组,但 IL-10 显著降低(均 $P < 0.05$);低、高剂量实验组的 IL-6 和 TNF- α 均显著低于模型组,但 IL-10 显

著升高(均 $P < 0.05$);AMPK 抑制剂组的 IL-6 和 TNF- α 均显著高于模型组,但 IL-10 显著降低(均 $P < 0.05$);没食子酸-H + AMPK 抑制剂组的 IL-6 和 TNF- α 均显著高于高剂量实验组,但 IL-10 显著降低(均 $P < 0.05$),没食子酸-H + AMPK 抑制剂组的 IL-6 和 TNF- α 均显著低于 AMPK 抑制剂组,但 IL-10 显著升高(均 $P < 0.05$),见表 2。

3 没食子酸对小鼠 SOD 和 MDA 的影响

模型组的 MDA 显著高于对照组,但 SOD 显著降低(均 $P < 0.05$);低、高剂量实验组的 MDA 显著低于模型组,但 SOD 显著升高(均 $P < 0.05$);AMPK 抑制剂组的 MDA 显著高于模型组,但 SOD 显著降低(均 $P < 0.05$);没食子酸-H + AMPK 抑制剂组的 MDA 显著高于高剂量实验组,但 SOD 显著降低(均 $P < 0.05$),没食子酸-H + AMPK 抑制剂组的 MDA 显著低于 AMPK 抑制剂组,但 SOD 显著升高($P < 0.05$),见表 3。

4 没食子酸对肝组织病理的影响

对照组、模型组、低剂量实验组、高剂量实验组、AMPK 抑制剂组和高剂量实验 + AMPK 抑制剂组的组织病理评分为 0、(2.64 $\pm$ 0.27)、(2.27 $\pm$ 0.24)、(1.22 $\pm$ 0.14)、(3.54 $\pm$ 0.36)和(2.19 $\pm$ 0.23)分,其中对照组肝组织中无炎性浸润,细胞排列整齐,大小和形态正常;模型组组织中大量炎症浸润,细胞边界

表 1 各组谷丙转氨酶 (GPT) 和谷草转氨酶 (GOT) 的比较 ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of glutamic pyruvic transaminase (GPT) and glutamic-oxalacetic transaminase (GOT) levels among different groups ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	GPT	GOT
Control	10	82.05 $\pm$ 8.31	50.23 $\pm$ 5.11
Model	10	210.20 $\pm$ 21.14 [*]	324.85 $\pm$ 33.25 [*]
Low-dose experimental	10	135.26 $\pm$ 14.64 [#]	152.34 $\pm$ 15.48 [#]
High-dose experimental	10	91.02 $\pm$ 9.21 ^{#Δ}	88.64 $\pm$ 8.95 ^{#Δ}
AMPK inhibitor	10	308.15 $\pm$ 30.85 [#]	482.62 $\pm$ 50.02 [#]
High-dose test + AMPK inhibitor	10	129.84 $\pm$ 13.08 ^{□$\&$}	148.85 $\pm$ 15.02 ^{□$\&$}

Compared with control group, ^{*} $P < 0.05$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$; Compared with low-dose experimental group, ^{Δ} $P < 0.05$; Compared with high-dose experimental group, [□] $P < 0.05$; Compared with AMPK inhibitor group, ^{$\&$} $P < 0.05$; Control group: The same volume of phosphate-buffered solution; Model group: The same volume of phosphate-buffered solution based on modeling; Low-dose experimental group: 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ gallic acid; High-dose experimental group: 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ gallic acid; AMPK inhibitor group: 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Compound C; Gallic acid + AMPK inhibitor group: 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Compound C + 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ gallic acid.

模糊, 肿胀破裂, 病理评分显著高于对照组 ($P < 0.05$); 没食子酸干预后, 肝炎细胞浸润和肝细胞肿胀得到缓解, 病理评分均显著低于模型组 (均 $P < 0.05$); 但 AMPK 抑制剂组病理损伤加重, 病理评分显著高于模型组 ($P < 0.05$); 高剂量实验 + AMPK 抑制剂组的病理损伤与低剂量实验组在统计学上差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 病理评分显著高于高剂量实验组 ($P < 0.05$), 但显著低于 AMPK 抑制剂组 ($P < 0.05$), 如图 1。

5 没食子酸对小鼠肝细胞凋亡的影响

对照组、模型组、低剂量实验组、高剂量实验组、AMPK 抑制剂组和高剂量实验 + AMPK 抑制剂组的凋

亡率为 (5.24 ± 0.54)%、(23.62 ± 2.44)%、(16.42 ± 1.72)%、(8.52 ± 0.89)%、(34.85 ± 3.61)% 和 (17.06 ± 1.75)%, 模型组凋亡率显著高于对照组 ($P < 0.05$); 低、高剂量实验组的凋亡率均显著低于模型组 (均 $P < 0.05$); AMPK 抑制剂组的凋亡率显著高于模型组 ($P < 0.05$); 没食子酸 - H + AMPK 抑制剂组的凋亡率显著高于高剂量实验组, 但显著低于 AMPK 抑制剂组 (均 $P < 0.05$)。

6 没食子酸对小鼠 p-AMPK/AMPK、Bax、Bcl-2 和 ACC 蛋白相对表达水平的影响

模型组的 Bax 和 ACC 蛋白相对表达水平均显著高于对照组, 但 p-AMPK/AMPK 和 Bcl-2 蛋白相对表达水平均显著低于对照组 (均 $P < 0.05$); 低、高剂量实验组的 Bax 和 ACC 蛋白相对表达水平均显著低于模型组, 但 p-AMPK/AMPK 和 Bcl-2 蛋白相对表达水平均显著高于对照组 (均 $P < 0.05$); AMPK 抑制剂组的 Bax 和 ACC 蛋白相对表达水平均显著高于模型组, 但 p-AMPK/AMPK 和 Bcl-2 蛋白相对表达水平均显著低于模型组 (均 $P < 0.05$); 没食子酸 - H + AMPK 抑制剂组的 Bax 和 ACC 蛋白相对表达水平均显著高于高剂量实验组, 但 p-AMPK/AMPK 和 Bcl-2 蛋白相对表达水平均显著低于高剂量实验组 (均 $P < 0.05$); 没食子酸 - H + AMPK 抑制剂组的 Bax 和 ACC 蛋白相对表达水平均显著低于 AMPK 抑制剂组, 但 p-AMPK/AMPK 和 Bcl-2 蛋白相对表达水平均显著高于 AMPK 抑制剂组 (均 $P < 0.05$), 见图 2 和表 4。

表 3 各组丙二醛 (MDA) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) among groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	SOD	MDA
		($U \cdot mg^{-1}$)	($nmol \cdot mg^{-1}$)
Control	10	48.26 ± 4.99	0.28 ± 0.03
Model	10	$19.52 \pm 2.11^*$	$0.84 \pm 0.09^*$
Low-dose experimental	10	$32.25 \pm 3.44^\#$	$0.56 \pm 0.06^\#$
High-dose experimental	10	$44.21 \pm 4.57^{\#\Delta}$	$0.31 \pm 0.04^{\#\Delta}$
AMPK inhibitor	10	$11.37 \pm 1.21^\#$	$1.31 \pm 0.15^\#$
High-dose experimental + AMPK inhibitor	10	$31.24 \pm 3.22^{\square\&}$	$0.64 \pm 0.07^{\square\&}$

Compared with control group, $^*P < 0.05$; Compared with model group, $^\#P < 0.05$; Compared with low-dose experimental group, $^\Delta P < 0.05$; Compared with high-dose experimental group, $^\square P < 0.05$; Compared with AMPK inhibitor group, $^\&P < 0.05$.

表 2 各组白细胞介素 (IL)-10、IL-6 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的比较 ($pg \cdot mL^{-1}, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of interleukin (IL)-10, IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) among groups ($pg \cdot mL^{-1}, \bar{x} \pm s$)

Group	n	IL-6	IL-10	TNF- α
Control	10	48.42 ± 4.92	486.52 ± 49.02	41.06 ± 4.37
Model	10	$134.52 \pm 13.58^*$	$188.72 \pm 19.08^*$	$149.85 \pm 15.28^*$
Low-dose experimental	10	$75.42 \pm 7.61^\#$	$318.54 \pm 32.08^\#$	$88.39 \pm 8.97^\#$
High-dose experimental	10	$57.85 \pm 5.81^{\#\Delta}$	$445.67 \pm 45.11^{\#\Delta}$	$51.06 \pm 5.21^{\#\Delta}$
AMPK inhibitor	10	$215.84 \pm 21.98^\#$	$114.21 \pm 11.94^\#$	$267.85 \pm 27.18^\#$
High-dose experimental + AMPK inhibitor	10	$78.62 \pm 7.98^{\square\&}$	$324.15 \pm 32.67^{\square\&}$	$154.62 \pm 15.68^{\square\&}$

Compared with control group, $^*P < 0.05$; Compared with model group, $^\#P < 0.05$; Compared with low-dose experimental group, $^\Delta P < 0.05$; Compared with high-dose experimental group, $^\square P < 0.05$; Compared with AMPK inhibitor group, $^\&P < 0.05$.

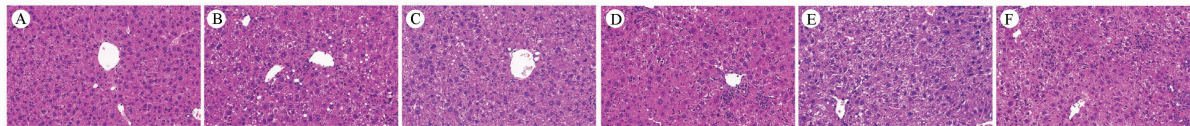


图 1 肝组织病理学变化 ($\times 400$)

Figure 1 Pathological changes in liver tissue ($\times 400$)

A: Control group; B: Model group; C: Low-dose experimental group; D: High-dose experimental group; E: AMPK inhibitor group; F: High-dose experimental + AMPK inhibitor group.

表 4 组织中乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC)、磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶 (p-AMPK)/AMPK、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 蛋白 (Bcl-2) 和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 相对表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of the relative expressions levels of acetyl-CoA carboxylase (ACC), phosphorylated adenosine monophosphate-activated protein kinase (p-AMPK)/AMPK, B-cell lymphoma/leukemia-2 protein (Bcl-2) and Bcl-2-related X protein (Bax) in the organization ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	p-AMPK/AMPK	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	ACC/ β -actin
Control	10	0.86 $\pm$ 0.09	0.18 $\pm$ 0.02	1.22 $\pm$ 0.14	0.25 $\pm$ 0.04
Model	10	0.32 $\pm$ 0.04 *	0.85 $\pm$ 0.09 *	0.55 $\pm$ 0.07 *	0.94 $\pm$ 0.10 *
Low-dose experimental	10	0.55 $\pm$ 0.06 #	0.59 $\pm$ 0.07 #	0.83 $\pm$ 0.09 #	0.66 $\pm$ 0.07 #
High-dose experimental	10	0.78 $\pm$ 0.08 # Δ	0.23 $\pm$ 0.03 # Δ	1.18 $\pm$ 0.13 # Δ	0.37 $\pm$ 0.05 # Δ
AMPK inhibitor	10	0.13 $\pm$ 0.02 #	1.33 $\pm$ 0.15 #	0.28 $\pm$ 0.04 #	1.49 $\pm$ 0.16 #
High-dose experimental + AMPK inhibitor	10	0.69 $\pm$ 0.08 # $\square$ &	0.64 $\pm$ 0.08 # $\square$ &	0.88 $\pm$ 0.10 # $\square$ &	0.71 $\pm$ 0.09 # $\square$ &

Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with model group, # $P < 0.05$; Compared with low-dose experimental group, $\Delta P < 0.05$; Compared with high-dose experimental group, $\square P < 0.05$; Compared with AMPK inhibitor group, & $P < 0.05$.

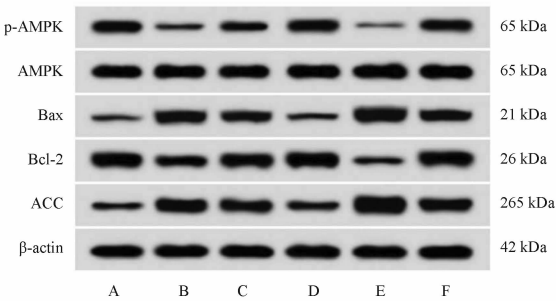


图 2 蛋白质印迹法检测组织中乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC)、磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶 (p-AMPK)、AMPK、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 蛋白 (Bcl-2) 和 Bcl-2 相关 X (Bax) 蛋白相对表达水平

Figure 2 The relative expression levels of acetyl-CoA carboxylase (ACC), phosphorylated adenosine monophosphate-activated protein kinase (p-AMPK), AMPK, B-cell lymphoma/leukemia-2 protein (Bcl-2) and Bcl-2-related X protein (Bax) in the tissue detected by Western blot

A-F: Refer to figure 1.

讨 论

AIH 是一种肝炎症, 发病率和死亡率较高^[11]。AIH 可能是由环境和遗传因素共同引起的, 但其确切的发病机制仍需进一步研究, 对于晚期或对药物治疗无反应的患者, 肝移植可能是最佳选择, 但供体短缺、费用高昂往往使其应用受限, 因此有必要为 AIH 患者寻找其他有效的药物。

刀豆蛋白 A 广泛用于构建 AIH 动物模型, 炎症是刀豆蛋白 A 介导肝损伤的主要原因, 募集、激活免疫细胞如 T 细胞、自然杀伤 T 细胞, 活化的免疫细胞释放大量的炎症因子, 高水平 TNF- α 和 IL-6 是 AIH 中

的主要致病性炎症细胞因子, 进一步加重肝炎症, 而 IL-10 作为抗炎因子, 可保护肝免受损伤^[12]。血清 GPT 和 GOT 是肝细胞死亡后释放到血液中的胞质酶, 被认为是肝毒性生化指标^[13], 结果表明, AIH 小鼠血清中肝损伤标志物增加, TNF- α 和 IL-6 水平增加, IL-10 降低, 表明肝损伤, 同时炎症反应显著。炎症反应还可能导致肝细胞凋亡, 并可能导致 AIH 患者出现肝纤维化和肝硬化, Bax 和 Bcl-2 分别代表促凋亡和抗凋亡蛋白, 与细胞凋亡密切相关^[14]。除了炎症损伤和细胞凋亡外, 刀豆蛋白 A 还可以通过刺激产生活性氧破坏脂质、糖类、核酸和蛋白质等细胞成分, 最终诱导肝过氧化损伤, 导致细胞凋亡, 其中 MDA 和 SOD 是最常用的氧化应激标志物^[15]。本研究发现, 刀豆蛋白 A 注射后 AIH 小鼠肝组织遭受过氧化损伤, 导致肝组织中细胞凋亡。没食子酸是一种天然存在的多酚化合物, 对肝损伤具有保护作用, 如胆汁性肝硬化引起肝损伤^[16]。在乙酸铈诱导肝功能障碍中, 没食子酸通过抗氧化和抗凋亡特性恢复了肝氧化还原稳定性和细胞功能。本研究显示, 没食子酸干预 AIH 小鼠后, 炎症反应和细胞凋亡降低, 减轻了过氧化损伤, 肝损伤得到缓解, 与上述研究指标变化趋势相符, 提示没食子酸保肝活性可能与抗氧化和抗炎及抗凋亡作用有关。

AMPK 是调节免疫细胞炎症反应以及脂质和葡萄糖代谢的关键信号, 该通路与 AIH 发生密切相关^[17]。ACC 是活化 AMPK 的下游靶标, 在调节肝中的脂肪酸氧化中至关重要。在非酒精性脂肪性肝炎研究中, 激活 AMPK/ACC 信号通路可降低脂肪沉积, 减缓脂肪酸氧化^[18]。同时 AMPK 已被证明是一种多功能抗炎蛋白, 研究表明, 甘丙肽激活 AMPK-ACC

信号通路可抑制非酒精性脂肪性肝炎中肝炎症,减轻肝损伤和纤维化^[19]。LU等^[20]研究表明,没食子酸通过调节 AMPK 和 ACC 表达减轻果糖喂养小鼠肝脂肪变性。本研究显示,AIH 小鼠组织中 AMPK 表达降低,ACC 表达增加,肝组织受损严重,提示 AIH 发生可能与抑制 AMPK/ACC 信号通路有关。但经没食子酸干预后,AMPK/ACC 信号通路被激活,AIH 小鼠氧化应激和炎症反应、细胞凋亡均得到抑制,肝组织损伤得到缓解,推断没食子酸对 AIH 小鼠保肝作用可能与激活 AMPK/ACC 信号通路有关。随后实验引入 AMPK 抑制剂 - Compound C,结果显示,Compound C 减弱了没食子酸对 AIH 小鼠保肝作用,表明没食子酸可能通过激活 AMPK/ACC 信号通路保护 AIH 引发的肝组织损伤。

本研究提示:尽管没食子酸在肝病中的保护作用已得到较多研究证实,但其在 AIH 的应用价值及具体作用机制尚未明确,相关研究仍较为匮乏。本研究深入探讨没食子酸对 AIH 小鼠肝组织损伤的改善效应,并重点揭示其通过调控 AMPK/ACC 信号通路完成,不仅填补了没食子酸在 AIH 中作用机制研究的空白,也为自身免疫性肝炎的治疗提供了新的潜在靶点与理论依据,丰富了该领域的现有认知。

参考文献:

- [1] KUO S L, SU C H, LAI K H, *et al.* Guizhi Fuling Wan ameliorates concanavalin A - induced autoimmune hepatitis in mice [J]. *Biomed J*, 2024, 48(1):10073—100742.
- [2] MOHAMED G A, IBRAHIM S R M, HAREERI R H, *et al.* Garcinone E mitigates oxidative inflammatory response and protects against experimental autoimmune hepatitis *via* modulation of Nrf2/HO - 1, NF - κ B and TNF - α /JNK axis [J]. *Nutrients*, 2022, 15(1):16—25.
- [3] ZHANG J, ZHANG W, YANG L, *et al.* Phytochemical gallic acid alleviates nonalcoholic fatty liver disease *via* AMPK - ACC - PPAR α axis through dual regulation of lipid metabolism and mitochondrial function [J]. *Phytomedicine*, 2023, 109(1):154589.
- [4] LU J, WANG C. Ferulic acid from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels ameliorates lipid metabolism in alcoholic liver disease *via* AMPK/ACC and PI3K/AKT pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 338(3):119118—119127.
- [5] 刘丹,程海林,罗剑锋. *miR* - 211 - 5p 靶向 TLR4 通路减轻自身免疫性肝炎小鼠肝损伤 [J]. 免疫学杂志, 2022, 38(10):838—845.
- [6] 翟晓瑞,霍明洋,周旋,等. 没食子酸对 D - 半乳糖致雌性小鼠肝脏损伤的保护作用 [J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(2):93—97.
- [7] 姚硕,李源,段超,等. 肉桂醛调节 AMPK/SREBP1c 信号通路对非酒精性脂肪性肝炎小鼠肝损伤的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2024, 41(2):438—447.
- [8] 陈琳,曹凡,宋忠兴,等. 五灵胶囊对刀豆蛋白 A 诱导自身免疫性肝炎小鼠的保护作用 [J]. 海军军医大学学报, 2025, 46(1):65—71.
- [9] FELDMAN A T, WOLFE D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1180(1):31—43.
- [10] 华倩,樊晓明,郭传勇,等. 根皮素对免疫性肝炎小鼠的保护作用及机制 [J]. 老年医学与保健, 2024, 30(2):469—476.
- [11] QUE W, LIN H, LI X, *et al.* Koumine ameliorates concanavalin A - induced autoimmune hepatitis in mice: Involvement of the Nrf2, NF - κ B pathways, and gut microbiota [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 114(1):109573—109582.
- [12] ZENG X, LIU M H, XIONG Y, *et al.* Pien Tze Huang alleviates Concanavalin A - induced autoimmune hepatitis by regulating intestinal microbiota and memory regulatory T cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2023, 29(45):5988—6016.
- [13] 田海霞,刘青青,康行,等. 夏枯草缓解小鼠自身免疫性肝炎的分子机制 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2020, 36(7):590—595.
- [14] ZHANG J, LIU Y, AN C, *et al.* Protective effect of ginsenoside CK against autoimmune hepatitis induced by concanavalin A [J]. *Foods*, 2023, 12(24):4379—4388.
- [15] CHEN Y, LEI Y, WANG H, *et al.* Sophoricoside attenuates autoimmunemediated liver injury through the regulation of oxidative stress and the NF κ B signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2023, 52(3):78—87.
- [16] JAFARIPOUR L, SOHRABI ZADEH B, JAFARIPOUR E, *et al.* Gallic acid improves liver cirrhosis by reducing oxidative stress and fibrogenesis in the liver of rats induced by bile duct ligation [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2023, 58(12):1474—1483.
- [17] SUN J, XU H, LI B, *et al.* IFITM1 aggravates ConA - induced autoimmune hepatitis by promoting NKT cell activation through increased AMPK - dependent mitochondrial function [J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 144(1):113692—113701.
- [18] YANG Y, WU Y, ZOU J, *et al.* Naringenin attenuates non - alcoholic fatty liver disease by enhancing energy expenditure and regulating autophagy *via* AMPK [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12(1):687095—687104.
- [19] HE L, HUANG C, WANG H, *et al.* Galanin ameliorates liver inflammation and fibrosis in mice by activating AMPK/ACC signaling and modifying macrophage inflammatory phenotype [J]. *Front Immunol*, 2023, 14(1):1161676—1161687.
- [20] LU Y, ZHANG C, SONG Y, *et al.* Gallic acid impairs fructose - driven de novo lipogenesis and ameliorates hepatic steatosis *via* AMPK - dependent suppression of SREBP - 1/ACC/FASN cascade [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 940(1):175457—175466.

(收稿日期 2025 - 05 - 14)