

肝细胞损伤模型中银杏内酯 A 保护机制 及对 Nrf2-抗氧化酶的影响

姜璐¹, 向楠², 姜侠³, 王伟芹⁴

摘要 目的 探讨银杏内酯 A 对四氯化碳 (CCl₄) 诱发的 HepG2 细胞损伤是否具有保护作用,并观察其对核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 调控的抗氧化酶的作用。方法 采用 CCl₄ 诱发 HepG2 细胞损伤,并予以不同剂量的银杏内酯 A 对其进行干预治疗,MTT 法检测细胞活性,ELISA 法检测细胞培养液中谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT) 浓度,并观察细胞 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG)、丙二醛 (MDA)、Nrf2、血红素氧合酶 1 (HO-1)、谷胱甘肽 (GSH) 水平。进而采用 PI3K/Akt、MAPK 通路拮抗剂干预,探索介导银杏内酯 A 发挥作用的上下游通路。结果 与对照组比较,CCl₄ 组 HepG2 细胞活性降低,细胞培养液 AST、ALT 浓度增加,细胞 8-OHdG、MDA 水平升高 ($P < 0.05$)。而与 CCl₄ 组比较,银杏内酯 A 可剂量依赖性的升高 HepG2 细胞活性,降低 AST、ALT 浓度,降低 8-OHdG、MDA 水平,同时显著升高 Nrf2、HO-1、GSH 水平 ($P < 0.05$)。此外,PI3K/Akt 拮抗剂 LY294002 与 p38 拮抗剂 SB203580 显著减弱了银杏内酯 A 对 HepG2 细胞的保护作用,并抑制了银杏内酯 A 对 Nrf2、HO-1、GSH 表达的上调作用 ($P < 0.05$)。结论 银杏内酯 A 对 CCl₄ 诱发的 HepG2 细胞损伤具有保护作用,其机制之一可能与通

过 PI3K/Akt、p38 通路上调 Nrf2、HO-1、GSH 表达、抑制氧化应激反应有关。

关键词 银杏内酯 A; HepG2 细胞; 四氯化碳; 氧化应激; Nrf2; HO-1; GSH

中图分类号 R 962

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)11-1587-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.002

肝脏在物质代谢、维持机体平衡方面具有重要作用。许多化学、生物等因素可导致肝脏损伤,进而引起肝硬化等,影响机体健康。过强的氧化应激反应是多种致病因素引发肝脏损伤的共同机制之一,抑制过强的氧化应激反应被认为是治疗肝损伤的一项重要策略^[1]。多种中药及其提取物被证实具有抗氧化作用并被用于治疗肝脏疾病^[2]。银杏内酯 A 是中药银杏干燥叶的提取物之一,研究^[3]显示银杏内酯 A 具有抗氧化活性,并被用于多种疾病的治疗。但银杏内酯 A 是否对肝脏损伤具有保护作用未见报道,该研究拟观察银杏内酯 A 对 CCl₄ 诱发的 HepG2 细胞损伤的保护作用,并探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 HepG2 细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 药品、试剂与仪器 MTT、CCl₄、PI3K/Akt 拮抗剂 LY294002、JNK 抑制剂 SP600125、p38 抑制剂

2017-05-31 接收

基金项目: 山东中医药管理基金 (编号: 2009-33)

作者单位: ¹ 山东中医药大学附属医院消化内镜诊疗科, 济南 250014

² 山东中医药大学, 济南 250355

³ 山东中医药高等专科学校中医经典教研室, 烟台 264199

⁴ 山东中医药大学附属医院, 济南 250014

作者简介: 姜璐, 女, 硕士, 主治医师, 责任作者, E-mail: 18615218099@163.com

SCN *in vivo* combining two-photon fluorescence imaging. **Methods** The surgery of skull base exposure was performed on the anesthetized mice and the calcium signals of SCN were real-time monitored by two-photon fluorescence microscopy after calcium indicator injected. **Results** A set of operative methods to expose the SCN at skull base of mice were successfully established. After surgery, the calcium signals of SCN were clearly monitored with two-photon microscopy. The fluorescence signals of calcium did not quench for a long time along with the detecting time and laser intensity, and the intracellular calcium imagings *in vivo* were stably displayed. The activity routine of spontaneous calcium responses was different in recording neurons. **Conclusion** After the surgery of exposing skull base in mouse, the real-time detection of calcium signals of neurons in SCN are successfully realized with two-photon microscopy.

Key words two-photon; fluorescence imaging; *in vivo*; calcium imaging; suprachiasmatic nucleus

SB203580、ERK 抑制剂 PD98059、银杏内酯 A (纯度 $\geq 98\%$, 150106) (美国 Sigma 公司); RPMI 1640 培养液、胎牛血清 (FBS) (美国 Gibco 公司); 谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶 (alanine transaminase, ALT) ELISA 试剂盒 (武汉华美公司); 丙二醛 (malondialde, MDA)、8-羟基脱氧鸟苷 (8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 8-OHdG)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 检测试剂盒 (南京建成公司); 核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) ELISA 试剂盒 (上海西唐生物公司); 血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) ELISA 试剂盒 (武汉新启迪生物公司); CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司); 酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG2 细胞培养于 RPMI 1640 培养液中, 培养液加入 10% FBS, 置于 5% CO₂、37 °C 饱和湿度环境中。根据细胞生长情况, 每 2~3 d 进行细胞传代。

1.2.2 银杏内酯 A 治疗方案 实验分为对照组、CCl₄ 组、CCl₄ + 银杏内酯 A 低剂量组、CCl₄ + 银杏内酯 A 中剂量组、CCl₄ + 银杏内酯 A 高剂量组。细胞常规培养 24 h 后, 银杏内酯 A 各组分别加入 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 银杏内酯 A 孵育 2 h; 此后, 除对照组外, 细胞培养液中均加入 0.4% CCl₄ 继续培养 22 h。

1.2.3 MTT 法检测细胞活性 细胞经上述处理后, 细胞培养液中加入 MTT (5 g/L) 孵育 4 h, 移去培养液用于备检指标。培养皿内加入 100 μl DMSO, 用酶标仪检测波长 570 nm 处各组吸光度值。

1.2.4 ALT、AST 检测 用 ELISA 法检测细胞培养液中 ALT、AST 含量, 操作严格按说明书进行。

1.2.5 Nrf2-抗氧化酶检测 将细胞进行匀浆, 收集匀浆液。ELISA 法检测匀浆液中 Nrf2、HO-1 含量, 用 MDA、8-OHdG、GSH 检测试剂盒检测 MDA、8-OHdG、GSH 浓度, 操作严格按说明书进行。

1.2.6 探索银杏内酯 A 对调节 Nrf2-抗氧化酶通路机制 实验分为正常组、CCl₄ 损伤组、CCl₄ 损伤 + 银杏内酯 A 治疗组、CCl₄ 损伤 + 银杏内酯 A + LY294002 组、CCl₄ 损伤 + 银杏内酯 A + SP600125 组、CCl₄ 损伤 + 银杏内酯 A + SB203580 组、CCl₄ 损伤 + 银杏内酯 A + PD98059 组。各组细胞经相应药物孵育 2 h 后 (银杏内酯 A 浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$) 细胞培养液中均加入 0.4% CCl₄ 继续培养 22 h。MTT 法检测细胞活性, 并检测细胞培养液中 ALT、AST 浓

度及细胞匀浆液中 Nrf2、HO-1、GSH 含量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用 q 检验进行比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 银杏内酯 A 对细胞活性的影响 与对照组比较, CCl₄ 组细胞活性显著降低 ($P < 0.05$), 而 CCl₄ + 银杏内酯 A 中剂量组、CCl₄ + 银杏内酯 A 高剂量组细胞活性均显著高于 CCl₄ 组 ($P < 0.05$), 且 CCl₄ + 银杏内酯 A 高剂量组细胞活性高于 CCl₄ + 银杏内酯 A 中剂量组 ($P < 0.05$), 但 CCl₄ + 银杏内酯 A 低剂量组与 CCl₄ 组细胞活性差异无统计学意义, 说明银杏内酯 A 可剂量依赖性的减轻 CCl₄ 所致的细胞损伤。见表 1。

2.2 银杏内酯 A 对细胞培养液中 AST、ALT 含量的影响 与对照组比较, CCl₄ 组细胞培养液中 ALT、AST 浓度显著升高 ($P < 0.05$), 而 CCl₄ + 银杏内酯 A 中剂量组、CCl₄ + 银杏内酯 A 高剂量组 ALT、AST 浓度显著低于 CCl₄ 组 ($P < 0.05$), 且 CCl₄ + 银杏内酯 A 高剂量组 ALT、AST 浓度低于 CCl₄ + 银杏内酯 A 中剂量组 ($P < 0.05$), 但 CCl₄ + 银杏内酯 A 低剂量组与 CCl₄ 组 ALT、AST 浓度差异无统计学意义, 说明银杏内酯 A 可以剂量依赖性的减少细胞释放 ALT、AST。见表 1。

2.3 银杏内酯 A 对 MDA、8-OHdG 的影响 与对照组比较, CCl₄ 组细胞 MDA、8-OHdG 水平显著升高 ($P < 0.05$), 而 CCl₄ + 银杏内酯 A 中剂量组、CCl₄ + 银杏内酯 A 高剂量组 MDA、8-OHdG 水平显著低于 CCl₄ 组 ($P < 0.05$), 且 CCl₄ + 银杏内酯 A 高剂量组 MDA、8-OHdG 水平低于银杏内酯 A 中剂量组 ($P < 0.05$), 但 CCl₄ + 银杏内酯 A 低剂量组与 CCl₄ 组 MDA、8-OHdG 水平差异无统计学意义, 说明银杏内酯 A 可以剂量依赖性的减弱细胞氧化应激水平。见表 2。

2.4 银杏内酯 A 对 Nrf2-抗氧化酶表达的影响 与对照组比较, CCl₄ 组 Nrf2、HO-1、GSH 表达显著升高 ($P < 0.05$), 而 CCl₄ + 银杏内酯 A 中剂量组、CCl₄ + 银杏内酯 A 高剂量组 Nrf2、HO-1、GSH 表达均较 CCl₄ 组进一步显著升高 ($P < 0.05$), 且 CCl₄ + 银杏内酯 A 高剂量组 Nrf2、HO-1、GSH 表达高于 CCl₄ + 银杏内酯 A 中剂量组 ($P < 0.05$), 但 CCl₄ + 银杏内酯 A 低剂量组与 CCl₄ 组 Nrf2、HO-1、GSH 表达差异无统计学意义, 说明银杏内酯 A 可以剂量依赖性的

升高细胞 Nrf2-抗氧化酶的表达。见表 2。

2.5 PI3/AKT、p38抑制剂对银杏内酯 A 药理作用的影响 与 CCl₄ 损伤组比较 CCl₄ 损伤 + 银杏内酯 A 治疗组细胞活性升高,培养液中 ALT、AST 浓度降低,Nrf2、HO-1、GSH 表达升高($P < 0.05$)。而与 CCl₄ 损伤 + 银杏内酯 A 治疗组比较,CCl₄ 损伤 + 银杏内酯 A + LY294002 组、CCl₄ 损伤 + 银杏内酯 A + SB203580 组细胞活性降低,培养液中 ALT、AST 浓

度升高,而 Nrf2、HO-1、GSH 表达降低($P < 0.05$),说明 PI3K/Akt 拮抗剂 LY294002 与 p38 拮抗剂 SB203580 阻断了银杏内酯 A 对细胞的保护作用及对 Nrf2-抗氧化酶的激活;但其他抑制剂组上述指标与 CCl₄ 损伤 + 银杏内酯 A 治疗组差异无统计学意义。表明 PI3K/Akt 及 p38 通路参与了银杏内酯 A 作用的发挥,而 ERK、JNK 通路参与了银杏内酯 A 作用的发挥无关。见图 1。

表 1 银杏内酯 A 对 HepG2 细胞活性、ALT 及 AST 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

项目	对照组	CCl ₄ 组	CCl ₄ + 银杏内酯 A			F 值	P 值
			A 低剂量组	中剂量组	A 高剂量组		
细胞活性(%)	100.00 ± 6.59	52.07 ± 5.35*	58.03 ± 7.00	67.90 ± 7.38 [△]	82.11 ± 8.05 [#]	62.27	0.000
ALT(IU/L)	22.64 ± 3.57	121.43 ± 13.60*	100.82 ± 10.98	82.34 ± 10.18 [△]	46.22 ± 6.71 [#]	138.06	0.000
AST(U/L)	27.74 ± 4.04	86.57 ± 10.54*	70.26 ± 9.51	67.52 ± 7.89 [△]	50.94 ± 7.35 [#]	59.51	0.000

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 CCl₄ 组比较: [△] $P < 0.05$; 与 CCl₄ + 银杏内酯 A 中剂量组比较: [#] $P < 0.05$

表 2 银杏内酯 A 对 MDA、8-OHdG、Nrf2、HO-1 及 GSH 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

项目	对照组	CCl ₄ 组	CCl ₄ + 银杏内酯 A			F 值	P 值
			低剂量组	中剂量组	高剂量组		
MDA(μmol/g Prot)	0.51 ± 0.69	1.31 ± 0.15*	1.12 ± 0.11	0.96 ± 0.11 [△]	0.78 ± 0.07 [#]	67.09	0.000
8-OHdG(μg/L)	3.06 ± 0.53	7.84 ± 0.94*	6.98 ± 0.91	6.07 ± 0.73 [△]	4.61 ± 0.60 [#]	50.16	0.000
Nrf2(μg/L)	17.66 ± 2.19	22.93 ± 2.11*	24.53 ± 2.66	28.95 ± 2.70 [△]	36.33 ± 3.32 [#]	56.64	0.000
HO-1(μg/L)	12.36 ± 1.54	16.17 ± 1.99*	19.08 ± 2.35	23.16 ± 3.03 [△]	29.88 ± 3.49 [#]	54.62	0.000
GSH(μmol/g Prot)	8.31 ± 1.02	12.24 ± 1.73*	13.73 ± 2.04	16.40 ± 2.38 [△]	21.19 ± 2.28 [#]	48.36	0.000

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 CCl₄ 组比较: [△] $P < 0.05$; 与 CCl₄ + 银杏内酯 A 中剂量组比较: [#] $P < 0.05$

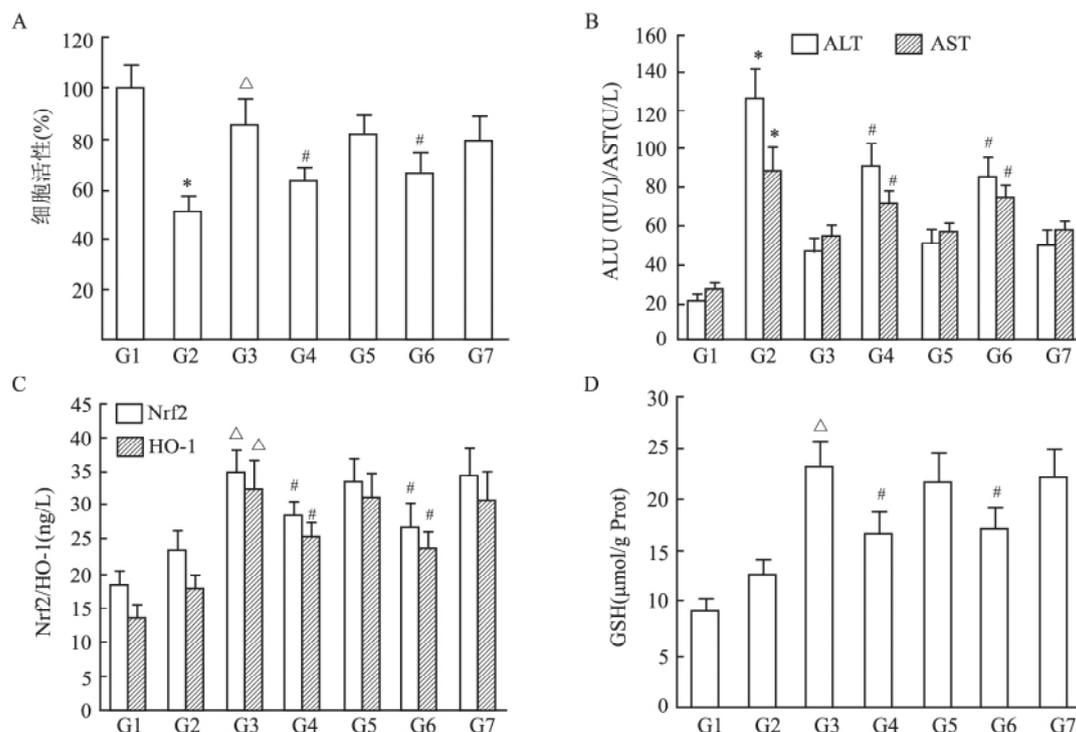


图 1 PI3/AKT、MAPK 抑制剂对银杏内酯 A 药理作用的影响

G1: 正常组; G2: CCl₄ 损伤组; G3: CCl₄ 损伤 + 银杏内酯 A 治疗组; G4: CCl₄ 损伤 + 银杏内酯 A + PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 组; G5: CCl₄ 损伤 + 银杏内酯 A + JNK 抑制剂 SP600125 组; G6: CCl₄ 损伤 + 银杏内酯 A + p38 抑制剂 SB203580 组; G7: CCl₄ 损伤 + 银杏内酯 A + ERK 抑制剂 PD98059 组; 与正常组比较: * $P < 0.05$; 与 CCl₄ 损伤组比较: [△] $P < 0.05$; 与 CCl₄ 损伤 + 银杏内酯 A 治疗组比较: [#] $P < 0.05$

3 讨论

传统中药及其提取物具有毒性相对较小、药理作用广泛的特点,被广泛用于肝病的防治。银杏内酯 A 是银杏干燥叶的提取物之一,研究^[4]证实它具有保护血管、抗炎等作用,但银杏内酯 A 对肝脏损伤是否具有保护作用未见报道,本研究通过细胞实验观察了银杏内酯 A 对 CCl₄ 诱发的 HepG2 细胞损伤的作用。CCl₄ 是一种有毒的化学物质,可引起肝损伤,常用于制备肝脏及体外肝细胞损伤模型^[5]。文献^[6]中 HepG2 细胞被广泛用于肿瘤研究及保肝药物的疗效评价。本研究结果显示,CCl₄ 组 HepG2 细胞活性显著降低,同时细胞释放的 ALT、AST 显著升高,表明 CCl₄ 对 HepG2 细胞引起了损伤,这与既往文献^[7]报道一致。然而,银杏内酯 A 剂量依赖性的升高了 HepG2 细胞活性,并降低了培养液中 ALT、AST 浓度,说明银杏内酯 A 对 CCl₄ 诱发的 HepG2 细胞损伤具有保护作用。除本研究显示银杏内酯 A 可保护肝细胞外,文献^[3]已报道银杏内酯 A 可对血管内皮等细胞发挥保护作用。

在众多的肝细胞损伤机制中,过强的氧化应激反应是许多致病因素诱发肝损伤的共同机制之一,抑制过强的氧化应激反应被认为是治疗肝损伤的一项重要策略^[1],许多具有抗氧化活性的传统中药及其提取物在肝病的防治中发挥了重要作用^[2]。文献^[8-9]显示 CCl₄ 诱发细胞损伤的主要机制之一即是引起过度的氧化应激反应,这与本研究中 CCl₄ 组 MDA、8-OHdG(DNA 氧化应激损伤的一种特异标志物)水平显著升高的结果相一致。而经过银杏内酯 A 处理,HepG2 细胞 MDA、8-OHdG 水平显著降低,说明银杏内酯 A 降低了 HepG2 细胞的氧化应激反应。

细胞对氧化应激的一项重要防御机制是增加抗氧化酶的活性。核转录因子 Nrf2 在维持机体氧化-抗氧化平衡方面发挥关键作用。Nrf2 通过与抗氧化反应元件(antioxidant response element ,ARE) 相互作用,启动 II 相解毒酶及抗氧化酶基因的表达,增加细胞的抗氧化能力^[10-11]。Nrf2-ARE 通路的下游抗氧化酶包括 HO-1、GSH 等,动物及体外细胞实验均证实,升高 Nrf2-ARE 通路活性,增加 HO-1、GSH 等表达,可清除氧化物质,对抗氧化应激引起的细胞损伤^[11-12]。总之,调节 Nrf2-ARE 抗氧化酶通路被认为是众多氧化应激相关疾病的一项重要治疗策略。本研究结果显示,CCl₄ 培养后,HepG2 细胞在

MDA、8-OHdG 等氧化标志物水平升高的同时,Nrf2、HO-1、GSH 表达也显著升高,这与文献^[13]中报道当机体处于氧化应激状态时 Nrf2-ARE 通路被激活相一致。然而,有趣的是经过银杏内酯 A 处理,Nrf2、HO-1、GSH 表达较 CCl₄ 组进一步大大升高,说明银杏内酯 A 可显著提高 Nrf2-ARE-抗氧化酶通路的活性。抗氧化酶表达的升高必定有利于 HepG2 细胞清除氧化物质,对抗 CCl₄ 诱发的损伤。这可能是银杏内酯 A 保护 HepG2 细胞的一条重要机制。与本研究显示的银杏内酯 A 作用类似,文献^[14]中报道其他一些药物也可通过上调 Nrf2-ARE-抗氧化酶通路活性而发挥肝脏保护作用。

研究^[15]表明,Nrf2-ARE-抗氧化酶通路受多条上游信号调节,如 PI3K/Akt、MAPK(p38 ,ERK 及 JNK) 等。本研究结果显示,PI3K/Akt 拮抗剂与 p38 拮抗剂显著减弱了银杏内酯 A 对 HepG2 细胞的保护作用,并抑制了银杏内酯 A 对 Nrf2、HO-1、GSH 表达的上调;而 ERK 拮抗剂及 JNK 拮抗剂对银杏内酯 A 的作用无显著影响。该结果表明银杏内酯 A 作用的发挥与 Nrf2-ARE-抗氧化酶通路的上游信号 PI3K/Akt、p38 有关,而与 ERK、JNK 无关。与本结果类似,其他研究也报道^[16],一些药物可通过 PI3K/Akt、p38、ERK、JNK 中的一条或者几条信号通路来调节 Nrf2-ARE-抗氧化酶的表达,从而发挥细胞保护作用。

本研究虽显示银杏内酯 A 作用的发挥与 PI3K/Akt、p38 通路有关,但亦显示 PI3K/Akt、p38 通路抑制后,银杏内酯 A 仍然对 HepG2 细胞仍有一定的保护作用,说明 PI3K/Akt、p38 通路只是介导银杏内酯 A 作用的途径之一,关于银杏内酯 A 保护 HepG2 细胞的其他可能机制值得进一步研究。

综上所述,银杏内酯 A 对 CCl₄ 诱发的 HepG2 细胞损伤具有保护作用,同时可抑制氧化应激反应,上述作用可能与银杏内酯 A 通过 PI3K/Akt、p38 通路上调 Nrf2、HO-1、GSH 表达有关。

参考文献

- [1] Li S, Tan H Y, Wang N, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(11): 26087-124.
- [2] Lam P, Cheung F, Tan H Y, et al. Hepatoprotective effects of Chinese medicinal herbs: a focus on anti-inflammatory and anti-oxidative activities[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(4): 465.
- [3] 郝艳玲,袁凤刚,孙红,等. 银杏内酯 A 对缺血/再灌注损伤的大鼠心功能的影响[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(4):

- 577–81.
- [4] Zhao Q, Gao C, Cui Z. Ginkgolide A reduces inflammatory response in high-glucose-stimulated human umbilical vein endothelial cells through STAT3-mediated pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 25(2): 242–8.
- [5] 钱正月, 李俊, 黄成, 等. 栀子柏皮汤不同配伍对四氯化碳诱导肝纤维化小鼠的治疗作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 51(1): 68–72.
- [6] Özerkan D, Özsoy N, Yılmaz E. Vitamin D and melatonin protect the cell's viability and ameliorate the CCl₄ induced cytotoxicity in HepG2 and Hep3B hepatoma cell lines [J]. *Cytotechnology*, 2015, 67(6): 995–1002.
- [7] Al-Sayed E, Esmat A. Hepatoprotective and antioxidant effect of ellagitannins and galloyl esters isolated from *Melaleuca styphelioides* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in HepG2 cells [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(9): 1727–35.
- [8] 冯芹, 夏文凯, 王现珍, 等. 连翘苷元对四氯化碳大鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(3): 426–30.
- [9] Çetin A, Çiftçi O, Otlu A. Protective effect of hesperidin on oxidative and histological liver damage following carbon tetrachloride administration in Wistar rats [J]. *Arch Med Sci*, 2016, 12(3): 486–93.
- [10] Lu M C, Ji J A, Jiang Z Y, et al. The Keap1-Nrf2-ARE pathway as a potential preventive and therapeutic target: an update [J]. *Med Res Rev*, 2016, 36(5): 924–63.
- [11] Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(17): 3221–47.
- [12] Choi Y H. Berberine hydrochloride protects C2C12 myoblast cells against oxidative stress-induced damage via induction of Nrf2-mediated HO-1 expression [J]. *Drug Dev Res*, 2016, 77(6): 310–8.
- [13] Gunjima K, Tomiyama R, Takakura K, et al. 3,4-dihydroxybenzalacetone protects against Parkinson's disease-related neurotoxin in 6-OHDA through Akt/Nrf2/glutathione pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2014, 15(1): 151–60.
- [14] Cho I, Kim J, Jung J, et al. Hepatoprotective effects of hoveniae semen cum fructus extracts in ethanol intoxicated mice [J]. *J Exerc Nutrition Biochem*, 2016, 20(1): 49–64.
- [15] Joo Choi R, Cheng M S, Shik Kim Y. Desoxyrhapontigenin up-regulates Nrf2-mediated heme oxygenase-1 expression in macrophages and inflammatory lung injury [J]. *Redox Biol*, 2014, 2: 504–12.
- [16] Ha do T, Oh J, Khoi N M, et al. *In vitro* and *in vivo* hepatoprotective effect of ganodermanotriol against t-BHP-induced oxidative stress [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(3): 875–85.

Protective mechanism of Ginkgolide A and influence of Nrf2-antioxidase in hepatocyte injury model

Jiang Lu¹, Xiang Nan², Jiang Xia³, et al

(¹Dept of Digestive Internal Medicine, The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014; ²Shandong University of Traditional Chinese Medicine Jinan 250355; ³Traditional Chinese Medicine Teaching and Research Section, Shandong College of Traditional Chinese Medicine, Yantai 264199)

Abstract Objective To investigate whether Ginkgolide A could attenuate carbon tetrachloride (CCl₄)-induced HepG2 cell damages and to detect its effects on Nrf2-antioxidases. **Methods** HepG2 cells were cultured with CCl₄ and treated with Ginkgolide A. Cell viability was detected using MTT assay. Levels of AST and ALT were measured using ELISA assay. In addition, levels of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG), malonaldehyde (MDA), heme oxygenase-1 (HO-1) and glutathione (GSH) were measured. In addition, inhibitors of PI3K/Akt and MAPK pathways were used to detect the pathways through which Ginkgolide A exerted its effects. **Results** Compared with the control group, the activity of HepG2 cells in CCl₄ group decreased, the concentrations of AST and ALT in cell culture medium increased, and the levels of 8-OHdG and MDA in cells were increased ($P < 0.05$). Compared to the CCl₄ group, Ginkgolide A with a dose-dependent manner increased cell viability, decreased levels of AST, ALT, 8-OHdG and MDA, as well as increased levels of Nrf2, HO-1 and GSH in HepG2 cells with a dose-dependent manner ($P < 0.05$). However, PI3K/Akt inhibitor and p38 inhibitor abolished the effects of Ginkgolide A in the CCl₄-cultured HepG2 cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Ginkgolide A can ameliorate the CCl₄-induced HepG2 cell damage, and Ginkgolide A may act by up-regulating the expression of Nrf2, HO-1 and GSH through PI3K/Akt and p38 pathways.

Key words Ginkgolide A; HepG2 cell; CCl₄; oxidative stress; Nrf2; HO-1; GSH