

甘草减轻雷公藤多苷片所致肝损伤的作用机制

赵明洪^{1,2}, 卢天明^{2,3}, 刘莉^{1,2}, 王启新², 杨通^{1,2}, 林娜², 邱崇², 钟田雨^{1*},
郭秋岩^{2*}, 王继刚^{1,2,3}

(1. 赣南医学院, 赣州 341000;

2. 中国中医科学院青蒿素研究中心, 中药研究所, 北京 100700;

3. 广西医科大学公共卫生学院, 南宁 530021)

[摘要] 目的:探究肝脏药物代谢关键酶细胞色素P4502D6(CYP2D6)、细胞色素P4503A4(CYP3A4)在甘草水提取物对急性肝损伤发挥保护作用的分子机制。方法:将健康雄性昆明种小鼠分为正常组、模型组、甘草水提取物低、中、高剂量组(5、10、15 g·kg⁻¹·d⁻¹)及阳性药甘草酸二铵组(75 mg·kg⁻¹·d⁻¹),每组10只。以预防给药1周后采用雷公藤多苷片270 mg·kg⁻¹单次灌胃诱导急性肝损伤模型,作用18 h后采集样本。采用苏木素-伊红(HE)染色观察肝脏病理变化;生化法检测血清中肝功能指标丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、 γ -谷氨酰转氨酶(γ -GT)、碱性磷酸酶(ALP)和总胆红素(TBIL)的含量及肝细胞氧化应激指标丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)的水平;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测肝脏药物代谢关键酶CYP2D6、CYP3A4的mRNA及蛋白表达水平。结果:与正常组比较,模型组小鼠肝细胞出现显著水肿及炎性细胞浸润($P<0.01$),AST、ALT、 γ -GT、ALP、TBIL明显增高($P<0.05$),MDA升高、SOD降低($P<0.01$),CYP2D6和CYP3A4的mRNA及蛋白表达量明显降低($P<0.05$);正常组小鼠肝组织结构完整未见明显异常,与模型组比较,甘草水提取物低、中、高剂量组和甘草酸二铵组可显著减轻肝细胞水肿程度及炎性细胞浸润程度($P<0.01$),AST、ALT、 γ -GT、ALP、TBIL的含量不同程度降低,MDA降低($P<0.01$),SOD升高($P<0.01$),CYP2D6和CYP3A4的mRNA及蛋白的表达量不同程度升高。结论:甘草水提取物对雷公藤多苷片所致急性肝损伤的保护作用,可能与降低血清中AST、ALT、 γ -GT、ALP、TBIL的水平;抑制肝细胞中MDA升高,增加SOD酶活力;提高肝脏药物代谢关键酶CYP2D6和CYP3A4的活性进而加速毒性物质代谢有关。

[关键词] 雷公藤多苷片;肝损伤;甘草;细胞色素P450

[中图分类号] R2-0;R33;R289;S859.82 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)05-0024-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20222039

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220811.1751.002.html>

[网络出版日期] 2022-08-12 13:54:18

Mechanism of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Alleviating *Tripterygium wilfordii* Polyglycoside Tablets-induced Liver Injury

ZHAO Minghong^{1,2}, LU Tianming^{2,3}, LIU Li^{1,2}, WANG Qixin², YANG Tong^{1,2}, LIN Na², QIU Chong²,
ZHONG Tianyu^{1*}, GUO Qiuyan^{2*}, WANG Jigang^{1,2,3}

(1. Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China;

2. Artemisinin Research Center, Institute of Chinese Materia Medica,
China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[收稿日期] 2022-02-26

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(82104480);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ14-YQ-060);青年人才托举工程项目(2021-QNRC2-B29);北京市自然科学基金青年基金项目(7214287)

[第一作者] 赵明洪,在读硕士,从事疾病的分子诊断及药物作用机制研究,E-mail:minghong21@163.com

[通信作者] *郭秋岩,博士,从事抗炎免疫中药药理研究,E-mail:qyguo@icmm.ac.cn;

*钟田雨,博士,从事临床疾病的分子诊断,E-mail:zhongtianyu@gmail.com

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of cytochrome P4502D6 (CYP2D6) and cytochrome P4503A4 (CYP3A4), key enzymes of drug metabolism in liver, on acute liver injury in water extract of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* (WEOGRR). **Method:** Healthy male Kunming mice were divided into normal group, model group, WEOGRR low-, medium- and high-dose groups (5, 10, 15 g·kg⁻¹·d⁻¹) and positive drug group (diammonium glycyrrhizinate, 75 mg·kg⁻¹·d⁻¹), with 10 in each group. One week after preventive administration, acute liver injury model was induced by single intragastric administration of 270 mg·kg⁻¹ Tripterygium Glycosides tablets, and samples were collected after 18 h. The pathological changes of liver were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Serum liver function indexes including alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT), alkaline phosphatase (ALP), and total bilirubin (TBIL) as well as the levels of oxidative stress indexes including malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in hepatocytes were determined by biochemical method. Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot were performed to detect the mRNA and protein expression levels of CYP2D6 and CYP3A4, respectively. **Result:** Compared with normal group, model group had significant hepatocyte swelling and inflammatory cell infiltration ($P<0.01$), increased AST, ALT, γ -GT, ALP and TBIL ($P<0.05$), elevated MDA and decreased SOD ($P<0.01$) as well as down-regulated mRNA and protein expression levels of CYP2D6 and CYP3A4 ($P<0.05$). Compared with the model group, the normal group had intact liver structure without obvious abnormality, and the WEOGRR groups and positive drug group presented alleviated hepatocyte swelling and inflammatory cell infiltration ($P<0.01$), reduced AST, ALT, γ -GT, ALP and TBIL ($P<0.01$), lowered MDA and increased SOD ($P<0.01$) as well as up-regulated expression levels of CYP2D6 and CYP3A4 ($P<0.01$). **Conclusion:** The protective effect of WEOGRR on acute liver injury induced by Tripterygium glycosides tablets may be related to reducing the contents of AST, ALT, γ -GT, ALP and TBIL in serum, inhibiting MDA and increasing the activity of SOD in liver cells, and enhancing the activities of CYP2D6 and CYP3A4, thus accelerating the metabolism of toxic substances.

[Keywords] *Tripterygium wilfordii* polyglycoside tablets; liver injury; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; cytochrome P450

肝脏具有分泌胆汁、参与代谢、生物转化、免疫调节等功能,然而,在生物转化过程中容易遭受外源性有毒物质侵害而导致肝损伤^[1],其中,药物不良反应是造成损伤主要原因之一,在住院患者中发病率高达10%~30%^[2]。药物及其代谢产物对肝脏造成的损害称为药物性肝损伤(DILI)^[3]。引起DILI的药物众多,包括对乙酰氨基酚(APAP)、曲格列酮、异烟肼、利福平,以及天然药物雷公藤、黄药子、何首乌等^[4-5]。这些药物因其肝损伤及其他脏器损伤危害而使用受限甚至退出市场。APAP引起的肝毒性占美国所有急性肝衰竭病例的46%^[6]。糖尿病药物曲格列酮因肝损伤相继退出了欧美和日本市场,而异烟肼、甲氨蝶呤等因可能诱发DILI等被美国食品药品监督管理局提出安全性警告^[7]。近年来中草药引起肝损伤的报道屡见不鲜,如急性肝炎和肝融合性坏死^[8]。中药引起的肝损伤中雷公藤位居前

主要限制因素^[9]。

中药雷公藤是卫矛科植物,具有抗炎、抗肿瘤、免疫调节、神经保护等作用^[10]。雷公藤多苷片(TGT)是从雷公藤根部提取精制而成具有脂溶性的糖苷^[11],具有免疫调节作用,临床常用于治疗自身免疫性炎症性疾病如肾病综合征、肾小球肾炎、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、银屑病、哮喘等^[12-13]。但是,雷公藤多苷片可导致急性肝损伤,肾损伤,胃肠道不良反应,生殖器官损伤及血液系统损伤等不良反应^[14-16]。在引起全身器官损伤作用中,肝损伤的发病率高达40%^[17]。肝损伤中以药物性肝炎、肝功能衰竭、急性肝损伤、胆汁淤积较为常见^[18]。临床症状主要表现为疲倦、乏力、厌食、恶心、压痛等^[19],血清中肝功能生化指标和氧化应激指标含量异常^[20-21]。

解毒圣药甘草,具有调和诸药、缓和药性作用,可与众多药物配伍,发挥保肝解毒等功效^[22]。甘草

解毒成分有甘草酸、甘草次酸、甘草甙等^[23]。已有报道甘草提取物用作保肝剂治疗四氯化碳、APAP及甲氨蝶呤诱导的DILI取得较好疗效^[7,24]。近来研究表明,中药配伍雷公藤制剂具有减毒作用,拓展了雷公藤的药物应用前景,能有效缓解肝损伤^[25-31]。因此,本文旨在探究甘草缓解TGT所致急性肝损伤的药效作用机制。本研究采用预给药方式,基于雷公藤多苷片所致急性肝损伤小鼠模型,通过苏木素-伊红(HE)切片观察肝脏病理变化;采用生化法检测血清中肝功能指标丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)、碱性磷酸酶(ALP)和总胆红素(TBIL)及细胞氧化应激指标丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)的血清水平,并通过实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot),检测其对2种经典的肝药酶细胞色素P4502D6(CYP2D6)、细胞色素P4503A4(CYP3A4)mRNA及蛋白表达水平的影响。初步阐述甘草水提物通过调节肝脏药物代谢关键酶的表达水平,改善TGT所致急性肝损伤的作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康雄性昆明种小鼠18~22 g,共60只,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,许可证号SYXK(京)2019-0010,动物饲养至中国中医科学院中药研究所动物房,实验单位使用许可证编号SYXK(京)2019-0003。饲养条件恒温、恒湿,饲料及饮水充足。本研究中的动物实验获得中国中医科学院中药研究所实验动物伦理委员会批准(批准号2021B110),并按照伦理要求尽可能地减少动物使用数量并减缓实验过程中动物的痛苦。

1.2 药品及试剂 甘草(北京同仁堂,经中国中医科学院王超副研究员鉴定质量合格),雷公藤多苷片(浙江得恩德制药股份有限公司,批号2004112B),甘草酸二铵胶囊(正大天晴药业集团股份有限公司,批号200105502);AST、ALT、ALP、TBIL、 γ -GT检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号分别为C010-2-1、C009-2-1、A059-2、C019-1、C017-2-1);MDA含量检测试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为BC0025、PC0020);总SOD活性检测试剂盒、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液(碧云天生物技术有限公司,货号分别为S0101S、P0015L);苏木精(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号CR2014124);伊红(珠海贝索生

物技术有限公司,批号C210601);TRIzol、逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(北京全式金生物技术有限公司,批号分别为O31103、P30923、P10325);CYP2D6抗体、CYP3A4抗体(英国Abcam公司,货号分别为CR3210034-6、CR3336523-2);抗兔免疫球蛋白(Ig)G二抗(美国Cell Signaling Technology公司,货号30);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,货号62u0922/6);化学发光检测试剂盒(上海雅梅生物科技有限公司,货号014711000)。

1.3 仪器 NanoDrop One型超微量分光光度计、Applied Biosystems Veriti型梯度PCR仪、ABI StepOnePlus型Real-time PCR仪(美国Thermo Fisher公司);EnVision型微孔板读板仪(美国PerkinElmer公司);Azure Biosystems C400可见荧光成像系统(美国Azure Biosystems公司);JY300HE型电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司)。

2 方法

2.1 药品制备 雷公藤多苷片和甘草酸二铵分别研磨成药粉,称取相应质量加入生理盐水溶解制成质量浓度为27、5.625 mg·L⁻¹的混悬液。甘草水提物制备,称取甘草135 g,加入水2 L,加热浓缩至300 mL,过滤,保存滤液。再加水1 L加热浓缩至300 mL,过滤。将2次滤液混合加热浓缩至质量浓度为1.125 g·L⁻¹的水提物,经稀释得到的甘草水提物中剂量组质量浓度为0.75 g·L⁻¹和甘草水提物低剂量组质量浓度为0.375 g·L⁻¹。

2.2 动物分组、造模及给药 将60只SPF级昆明种小鼠随机分为空白组、模型组、甘草水提物低、中、高剂量组(5、10、15 g·kg⁻¹·d⁻¹,给药剂量参考文献中甘草水提物剂量分别为5、15 g·kg⁻¹·d⁻¹对急性肝损伤有明显保护作用而设定^[32])和阳性药甘草酸二铵组(75 mg·kg⁻¹·d⁻¹)^[33],每组10只。甘草水提物低、中、高剂量组和甘草酸二铵组每日灌胃给药,正常组和模型组用等体积生理盐水灌胃,连续7 d。

雷公藤多苷诱导急性肝损伤模型的构建:给药组在预给药7 d后,除正常组外,各组均灌胃雷公藤多苷片溶剂(270 mg·kg⁻¹,给药剂量参考文献^[33]),作用18 h后采集标本。

2.3 观察及检测指标

2.3.1 HE染色观察肝脏病理形态 用4%多聚甲醛固定的肝组织,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片,

脱蜡染色,光镜下观察肝脏病理变化。对HE图片进行半定量方法评价肝组织病理损伤程度^[34],"0"为正常肝细胞结构;"I"为肝细胞轻度肿胀,散在炎性细胞,肝细胞点状坏死;"II"为肝细胞局灶性或斑片状坏死小于肝小叶的1/3,局灶性炎性细胞浸润;"III"为肝细胞广泛坏死,约1/3~1/2肝小叶,斑片状炎性细胞浸润;"IV"为肝细胞坏死超过1/2的肝小叶,严重的斑片状炎性细胞浸润。

2.3.2 生化法检测AST、ALT、 γ -GT、ALP、TBIL、MDA、SOD的水平 取-80℃保存的血清样本,按照试剂盒说明书指南检测血清中AST、ALT、 γ -GT、ALP、TBIL、MDA、SOD的水平。

2.3.3 Real-time PCR检测CYP2D6、CYP3A4的mRNA表达水平 取适量肝脏组织加入TRIzol进行组织研磨至匀浆、三氯甲烷抽提和异丙醇沉淀提取RNA。将提纯的RNA逆转录为cDNA,将cDNA进行Real-time PCR仪扩增,检测CYP2D6和CYP3A4的mRNA表达量。反应条件为94℃预变性30 s,94℃变性5 s,60℃退火15 s,72℃延伸10 s,共40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算mRNA表达量,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
CYP2D6	上游GGTAGGGTCCCAGGTCGTCT	20
	下游CTATGCCTGCCGCTTTGAGT	20
CYP3A4	上游GGCAAGCCTGTTACTATGAAAG	22
	下游ACTGAGAAGAGCAAAGGATCAA	22
GAPDH	上游CGTGCCGCTGGAGAAACC	19
	下游TGGAAGAGTGGGAGTTGCTGTTG	23

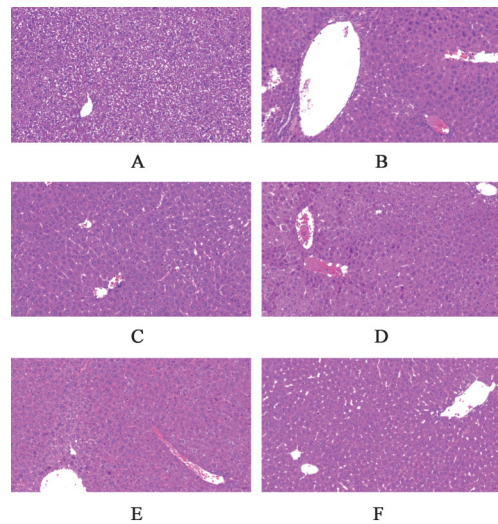
2.3.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝脏CYP2D6、CYP3A4蛋白表达水平 将肝脏组织用手术剪剪碎后,取100 mg于离心管中。加入RIPA裂解液与蛋白酶抑制剂按100:1比例的混合裂解液500 μ L,放置冰上裂解30 min。4℃、12 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径6 cm),吸取上清,BCA蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度并调平蛋白浓度。SDS-PAGE电泳,转膜,摇床上室温封闭1 h后TBST洗膜,用CYP2D6(1:1 000)、CYP3A4(1:2 000)、GAPDH(1:3 000)的兔多克隆抗体4℃孵育过夜。TBST洗膜后加入抗兔IgG二抗(1:3 000),室温孵育1 h。TBST洗膜后显影,使用Image J软件做蛋白

定量分析。

2.3.5 统计学分析 采用GraphPadPrism 9.0版本进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,满足正态性和方差齐性用单因素方差分析(One-way ANOVA);满足正态性但不满足方差齐性用Welch检验和Brown-Forsythe检验;不满足正态性用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对雷公藤多苷片所致小鼠肝损伤病理变化的影响 结果显示,正常组小鼠的肝脏肝小叶结构清晰,肝细胞排列规则,无炎症细胞浸润;与正常组比较,模型组小鼠肝脏明显出现炎症细胞浸润并且肝细胞明显肿大,胞浆稀疏呈网状,半透明,胞浆界限不明显,并含有淡黄色透明物质沉着,肝细胞坏死明显;与模型组比较,甘草水提取物低、中、高剂量组及甘草酸二铵组均可不同程度减轻炎症细胞浸润和肝细胞肿大,肝细胞坏死减少。见图1。肝脏组织病理损害半定量结果显示,与正常组比较,模型组小鼠肝组织广泛损伤,多为IV级($P < 0.01$);与模型组比较,甘草水提取物低、中、高剂量组和甘草酸二铵组的肝损害分级显著减轻,多为I到II级($P < 0.01$)。见表2。



注:A.正常组;B.模型组;C.甘草酸二铵组;D.甘草水提取物低剂量组;E.甘草水提取物中剂量组;F.甘草水提取物高剂量组(图2同)

图1 甘草水提取物对小鼠肝脏组织病理变化的影响(HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of water extract of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma (WEOGRR) on pathological changes of liver tissue in mice (HE, $\times 200$)

3.2 对雷公藤多苷片所致急性肝损伤小鼠血清中AST、ALT、 γ -GT、ALP、TBIL水平的影响 与正常组比较,模型组血清中肝功能指标AST、ALT、

表2 甘草水提取物对小鼠肝脏组织病理损害程度的影响 (n=10)

Table 2 Effect of WEOGRR on pathological damage degree of liver tissue in mice (n=10) 只

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	肝损伤程度				
		0	I	II	III	IV
正常组		10	0	0	0	0
模型组		0 ²⁾	0 ²⁾	0 ²⁾	2 ²⁾	8 ²⁾
甘草酸二铵组	0.075	5 ⁴⁾	4 ⁴⁾	1 ⁴⁾	0 ⁴⁾	0 ⁴⁾
甘草水提取物低剂量组	5	0 ⁴⁾	1 ⁴⁾	7 ⁴⁾	2 ⁴⁾	0 ⁴⁾
甘草水提取物中剂量组	10	2 ⁴⁾	4 ⁴⁾	4 ⁴⁾	0 ⁴⁾	0 ⁴⁾
甘草水提取物高剂量组	15	3 ⁴⁾	6 ⁴⁾	1 ⁴⁾	0 ⁴⁾	0 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.05;²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05;⁴⁾P<0.01(表3-表6同)

γ -GT、ALP、TBIL 明显升高,差异具有统计学意义 ($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,甘草水提取物低、中、高剂量组和甘草酸二铵组血清中 AST、ALT、ALP、TBIL 和 γ -GT 均降低,其中甘草水提取物高剂量组血清中 AST、ALT 和 ALP 降低具有显著性 ($P<0.01$)。见表3。

3.3 对雷公藤多苷片所致急性肝损伤小鼠血清中氧化应激指标 MDA、SOD 水平的影响 与正常组

比较,模型组血清中反映肝细胞氧化应激指标 MDA 显著升高 ($P<0.01$), SOD 显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,甘草水提取物低、中、高剂量组和甘草酸二铵组 MDA 水平显著降低 ($P<0.01$), SOD 水平显著升高 ($P<0.01$)。见表4。

3.4 对雷公藤多苷片所致急性肝损伤小鼠肝脏中 CYP2D6 和 CYP3A4 mRNA 表达水平的影响 雷公藤多苷诱发小鼠 DILI 后,与正常组比较,模型组肝脏中主要的药物代谢酶 CYP2D6 和 CYP3A4 mRNA 表达量显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,甘草酸二铵组及中、高剂量的甘草水提取物小鼠肝脏组织中的 CYP2D6 和 CYP3A4 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.01$)。见表5。

3.5 对雷公藤多苷片所致急性肝损伤小鼠肝脏中 CYP2D6 和 CYP3A4 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组 CYP2D6 和 CYP3A4 蛋白表达量明显降低 ($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,甘草水提取物低、中、高剂量组和甘草酸二铵组均上调了 CYP2D6 和 CYP3A4 蛋白表达水平,其中以甘草水提取物中剂量组上调 CYP2D6 和甘草酸二铵组上调 CYP3A4 蛋白表达量最为明显 ($P<0.05, P<0.01$)。见图2和表6。

表3 甘草水提取物对小鼠血清中 AST、ALT、 γ -GT、ALP、TBIL 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effect of WEOGRR on AST, ALT, γ -GT, ALP and TBIL levels in mice serum ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	γ -GT/U·L ⁻¹	ALP/U·L ⁻¹	TBIL/ μ mol·L ⁻¹
正常组		40.07 \pm 17.07	28.35 \pm 5.05	11.17 \pm 3.86	238.50 \pm 44.94	19.23 \pm 5.28
模型组		516.55 \pm 147.11 ²⁾	178.61 \pm 37.74 ²⁾	35.85 \pm 6.10 ²⁾	320.85 \pm 71.52 ¹⁾	126.42 \pm 68.68 ¹⁾
甘草酸二铵组	0.075	153.94 \pm 100.11 ³⁾	77.67 \pm 33.02	21.52 \pm 5.74 ³⁾	230.47 \pm 51.95 ³⁾	34.18 \pm 6.92
甘草水提取物低剂量组	5	278.12 \pm 200.94	88.51 \pm 32.75	15.85 \pm 2.73 ⁴⁾	244.13 \pm 42.79	30.10 \pm 10.09 ⁴⁾
甘草水提取物中剂量组	10	114.32 \pm 94.57 ³⁾	76.91 \pm 45.26	18.01 \pm 4.76	237.15 \pm 81.46 ³⁾	33.67 \pm 5.00
甘草水提取物高剂量组	15	85.08 \pm 78.99 ⁴⁾	61.31 \pm 31.03 ⁴⁾	19.96 \pm 5.81	219.02 \pm 49.05 ⁴⁾	30.78 \pm 4.64

4 讨论

近来天然药物引发的肝脏毒性日渐引起广泛关注^[35]。雷公藤多苷片常作为中药免疫抑制剂,用于治疗多种自身免疫性疾病,但其导致 DILI 的报道屡见不鲜^[36]。雷公藤多苷引起的肝损伤常表现为血清中转氨酶 ALT、AST 升高,高胆红素血症,黄疸,血尿素氮增高,肝肿大、肝衰竭及反应自由基清除水平的抗氧化物 SOD 含量降低^[37-39]。

目前认为雷公藤引起肝损伤的可能机制有诱导细胞凋亡、氧化应激、促炎因子 TNF- α 过度释放等^[4]。其中,细胞色素 P450 调节药物的生物转化及自由基学说的认可度较高,多价不饱和脂肪酸在自由基诱导下过氧化生成 MDA,MDA 可使蛋白质、核

酸等受损及生物膜性质改变,细胞衰老或凋亡。引发肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 、IL-10 的过度释放,这些促炎因子又增强了细胞氧化应激使得肝细胞损伤更为严重。而细胞依赖 SOD 清除自由基,阻断自由基的链式反应对细胞的损害而保护肝细胞。当大量雷公藤多苷进入肝脏代谢时,肝细胞膜和线粒体膜变性溶解,ALT、 γ -GT 和 AST 释放进入血液,表明肝实质性损伤^[40]。由于 ALT 存在于肝细胞质中且在肝脏中浓度最大,雷公藤多苷引起的急性肝炎时,肝细胞通透性增加,细胞质中 ALT 大量释放入血,是急性肝损伤非常灵敏的指标。而 AST 存在于线粒体中,在急性肝炎时线粒体损害较轻,因此 AST 升高不如 ALT 明

显^[41]。雷公多苷引起药物中毒的肝损伤可表现为胆汁淤积、胆道阻塞,造成存在于胆管上皮细胞中 γ -GT和ALP释放增多,血清中 γ -GT和ALP水平急剧上升^[42]。雷公藤多苷引起急性肝炎时,因胆道梗阻或肝细胞破坏导致肝脏对未结合胆红素的摄取和结合能力降低,以及对结合胆红素的排泄受阻导致血清中总胆红素升高^[43],通过血清总胆红素能灵敏的反映肝脏的受损情况。本研究中雷公藤多苷片所致急性肝损伤模型后,小鼠血清中肝功能生化指标AST、ALT、 γ -GT、ALP、TBIL急剧升高。甘草水提取物低、中、高剂量组上述指标升高程度均有所缓解,通过肝功能指标反映了甘草水提取物预给药后雷公藤多苷片所致肝损伤得到改善,甘草水提取物有护肝作用。

表4 甘草水提取物对小鼠血清中MDA、SOD表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Effect of WEOGRR on expression levels of MDA and SOD in mice serum ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MDA含量/nmol·L ⁻¹	SOD酶活力/U
正常组		3.37±1.43	1.21±0.18
模型组		6.71±2.40 ²⁾	0.52±0.13 ²⁾
甘草酸二铵组	0.075	3.01±2.14 ⁴⁾	1.25±0.36 ⁴⁾
甘草水提取物低剂量组	5	2.37±1.60 ⁴⁾	1.14±0.20 ⁴⁾
甘草水提取物中剂量组	10	2.78±2.09 ⁴⁾	1.14±0.20 ⁴⁾
甘草水提取物高剂量组	15	1.74±1.24 ⁴⁾	1.13±0.32 ⁴⁾

表5 甘草水提取物对小鼠肝脏中CYP2D6和CYP3A4 mRNA表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 5 Effect of WEOGRR on mRNA expression levels of CYP2D6 and CYP3A4 in mice liver ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CYP2D6	CYP3A4
正常组		1.00±0.08	1.00±0.06
模型组		0.34±0.01 ²⁾	0.09±0.01 ²⁾
甘草酸二铵组	0.075	0.81±0.04 ⁴⁾	0.88±0.16 ⁴⁾
甘草水提取物低剂量组	5	0.41±0.02	0.32±0.01 ⁴⁾
甘草水提取物中剂量组	10	0.46±0.05 ⁴⁾	0.19±0.02 ⁴⁾
甘草水提取物高剂量组	15	0.50±0.02 ⁴⁾	0.54±0.02 ⁴⁾

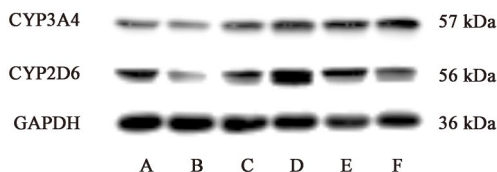


图2 小鼠肝脏中CYP2D6和CYP3A4蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of CYP2D6 and CYP3A4 protein expression levels in mice liver

表6 甘草水提取物对小鼠肝脏中CYP2D6和CYP3A4蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of WEOGRR on CYP2D6 and CYP3A4 protein expression levels in mice liver ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CYP2D6/GAPDH	CYP3A4/GAPDH
正常组		1.22±0.26	1.06±0.41
模型组		0.67±0.11 ²⁾	0.60±0.28 ¹⁾
甘草酸二铵组	0.075	0.87±0.21	1.14±0.26 ³⁾
甘草水提取物低剂量组	5	0.78±0.15	0.73±0.32
甘草水提取物中剂量组	10	1.06±0.25 ⁴⁾	0.96±0.20
甘草水提取物高剂量组	15	0.90±0.17	0.98±0.23

雷公藤多苷片引起的急性肝损伤中,细胞内氧化与抗氧化失衡。自由基在肝细胞内过多积聚而产生大量脂质过氧化产物MDA导致细胞毒性作用,而具有清除自由基的发挥抗氧化作用的SOD活性降低,造成肝细胞损伤和凋亡^[44-45]。本研究通过测定血清中MDA含量和SOD酶活性发现,甘草水提取物低、中、高剂量组缓解了MDA含量的急剧升高且SOD酶活力增加,表明甘草水提取物可能通过减轻肝细胞氧化应激水平而改善肝损伤。

近来研究表明,细胞色素P450在雷公藤引起的肝损伤中发挥着重要的作用。其中参与药物代谢的主要酶亚型是CYP3A4、CYP2D6,而CYP3A4含量最高且主导50%的药物代谢,在肝脏药物清除过程中发挥着重要作用^[46]。雷公藤多苷片对CYP3A4酶活性有较强抑制作用,CYP3A4和CYP2D6酶活性抑制或基因表达降低可引起药物代谢异常,导致雷公藤多苷及其代谢产物在肝内清除缓慢、大量蓄积,增强肝损伤作用引起肝细胞大量水肿坏死,炎症细胞浸润,肝细胞脂肪变性等组织病理改变^[47-50]。而甘草可改善肝损伤后释放入血的TBIL、AST、ALT水平,上调细胞色素P450的表达而增强药物代谢水平,对肝细胞具有较好的保护作用^[51-52]。本研究中雷公藤多苷片造模后可显著降低CYP3A4和CYP2D6 mRNA及蛋白表达水平,抑制药物的代谢。而甘草水提取物低、中、高剂量组和甘草酸二铵组增强了CYP3A4和CYP2D6 mRNA及蛋白的表达量,使雷公藤多苷的药物代谢率加快,缓解药物在肝脏的长时间滞留从而减轻肝损伤。此外,病理切片显示,甘草水提取物高剂量预给药组肝细胞水肿减轻,炎症细胞数目较少,形态趋于正常。

综上,本研究基于雷公藤多苷片诱导的急性肝损伤小鼠模型发现,甘草水提取物预给药可以有效减

轻肝脏的病理学变化;降低血清中肝功能指标AST、ALT、 γ -GT、ALP、TBIL的水平;抑制MDA含量上升并增加了SOD酶活力;升高肝脏组织中肝脏药物代谢酶CYP3A4和CYP2D6 mRNA及蛋白表达量;因此,甘草水提物缓解雷公藤多苷片所致肝损伤的作用机制可能与加速活性氧的清除及提高有毒药物的代谢速率,从而发挥肝脏保护作用。本研究为雷公藤配伍甘草减轻药物毒性作用提供了新的线索,有望解决雷公藤临床用药受限的难题,以及为甘草减轻雷公藤多苷片所致肝损伤的作用机制提供了一定的理论参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 董颖,陈鑫沛,杨浩铨,等. 葡萄籽油对急性肝损伤的保护作用[J]. 食品工业科技, 2021, doi: 10.13386/j.issn1002-0306.
- [2] 池肇春. 药物性肝损伤研究现状与进展[J]. 世界华人消化杂志, 2021, 29(16): 915-925.
- [3] 朱欣欣,万朝敏. 儿童药物性肝损害[J]. 临床肝胆病杂志, 2012, 28(12): 896-898.
- [4] 张俊立,扈晓宇. 天然药物相关肝损伤毒理学研究进展[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(6): 167-174.
- [5] 李晓芸,唐洁婷. 药物性肝损伤的流行病学[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(11): 2510-2514.
- [6] LEE W M. Acetaminophen (APAP) hepatotoxicity-Isn't it time for APAP to go away?[J]. J Hepatol, 2017, 67(6): 1324-1331.
- [7] BHATT S, SHARMA A, DOGRA A, et al. Glabridin attenuates paracetamol-induced liver injury in mice via CYP2E1-mediated inhibition of oxidative stress [J]. Drug Chem Toxicol, 2022, 45(5): 2352-2360.
- [8] 寇晓彤,李琦,陈畅. 药物诱导的肝损伤研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(21): 2981-2984.
- [9] LI X X, DU F Y, LIU H X, et al. Investigation of the active components in *Tripterygium wilfordii* leading to its acute hepatotoxicity and nephrotoxicity [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 162: 238-243.
- [10] 农程,王欣之,江振洲,等. 雷公藤对免疫系统作用及机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16): 3374-3383.
- [11] LI Q, HUANG Y, LIU P, et al. Effect of *Tripterygium wilfordii* polyglycoside tablets on serum inflammatory factors and T cells in patients with chronic nephritis [J]. Am J Transl Res, 2021, 13(7): 8385-8390.
- [12] 付晓春,沈小莉,蒋平. 雷公藤多苷药理作用及肝毒性机制研究[J]. 医学信息, 2020, 33(5): 37-39.
- [13] 姜淼,张海波,丁樱. 雷公藤多苷药理作用及临床应用研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(3): 59-63.
- [14] 何康婧,高增平,尹丽梅,等. 雷公藤多苷的药理毒理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(1): 196-204.
- [15] 任献青,丁樱. 雷公藤多苷肝损伤副作用的临床观察及对策[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(5): 1207-1208.
- [16] 樊媛芳,徐颖,苏晓慧,等. 雷公藤多苷片对II型胶原诱导性关节炎雌性大鼠生殖毒性的影响[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16): 3486-3493.
- [17] 田雅格,苏晓慧,刘立玲,等. 近20年来雷公藤肝毒性研究概述[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16): 3399-3405.
- [18] 罗岚,江振洲,张陆勇. 雷公藤多苷肝毒性发生机制及减毒相关研究进展[J]. 药物评价研究, 2017, 40(10): 1504-1509.
- [19] 吴利兰. 新生儿高胆红素血症68例临床病因分析[J]. 湖南中医药大学学报, 2012, 32(2): 21-22, 24.
- [20] WANG J, MIAO M, ZHANG Y, et al. Quercetin ameliorates liver injury induced with Tripterygium glycosides by reducing oxidative stress and inflammation [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2015, 93(6): 427-433.
- [21] 涂文玲,黄妙安,洪银洁,等. 基于Hedgehog信号通路探讨柴芍六君汤对肝郁脾虚型CAG大鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(4): 1-8.
- [22] HUO H Z, WANG B, LIANG Y K, et al. Hepatoprotective and antioxidant effects of licorice extract against CCl₄-induced oxidative damage in rats [J]. Int J Mol Sci, 2011, 12(10): 6529-6543.
- [23] LIN G, NNANE I P, CHENG T Y. The effects of pretreatment with glycyrrhizin and glycyrrhetic acid on the retrorsine-induced hepatotoxicity in rats [J]. Toxicol, 1999, 37(9): 1259-1270.
- [24] CHAUHAN P, SHARMA H, KUMAR U, et al. Protective effects of Glycyrrhiza glabra supplementation against methotrexate-induced hepatorenal damage in rats: An experimental approach [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 263: 113209.
- [25] 马致洁,章从恩,唐进法,等. 雷公藤配伍甘草降低肝毒性的代谢通路探讨[J]. 药学学报, 2017, 52(7): 1077-1084.
- [26] 张依,王晓月,丁子禾,等. 中药配伍雷公藤制剂治疗类风湿关节炎的安全性系统评价及其增效减毒网络调控机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(5): 1-8.
- [27] 杨一博,徐颖,王璐,等. 基于Notch信号通路探索莨

- 丝子总黄酮配伍雷公藤多苷对生理小鼠卵巢生殖干细胞的作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(5):9-15.
- [28] 王晓月,张依,陈文佳,等. 从临床多组学整合调控网络探究雷公藤多苷片治疗类风湿关节炎的“效-毒”关联机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(5):49-57.
- [29] 段凤阳,宋纯东,宋丹,等. 雷公藤多苷对糖尿病肾病大鼠肾组织NFAT2/COX-2表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(5):16-23.
- [30] 杨超,胡智星,明瑞蕊,等. 雷公藤多苷片联用甲氨蝶呤和/或来氟米特对类风湿关节炎自身抗体影响的Meta分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(5):39-48.
- [31] 朱子衡,万磊,刘健,等. 基于Apriori关联规则和随机行走模型研究复方雷公藤制剂(新风胶囊)改善类风湿关节炎脾虚湿盛证免疫炎症的临床疗效[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(5):32-38.
- [32] 郭雷,李慧,王振华,等. 甘草提取物、石见穿提取物、紫参汤对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用的比较[J]. 石河子大学学报:自然科学版, 2010, 28(6):727-730.
- [33] SHI Q, WANG Q, CHEN J, et al. Transcriptome and lipid metabolomics-based discovery: Glycyrrhizic acid alleviates tripterygium glycoside tablet-induced acute liver injury by regulating the activities of CYP and the metabolism of phosphoglycerides [J]. Front Pharmacol, 2021, 12:822154.
- [34] WANG F, XUE Y, YANG J, et al. Hepatoprotective effect of apple polyphenols against concanavalin A-induced immunological liver injury in mice[J]. Chem Biol Interact, 2016, 258:159-165.
- [35] LIU C, FAN H, LI Y, et al. Research advances on hepatotoxicity of herbal medicines in China [J]. Biomed Res Int, 2016, doi:10.1155/2016/7150391.
- [36] 付晓春,沈小莉,蒋平. 雷公藤多苷肝脏毒性研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(36):4102-4104.
- [37] 杨冬梅,刘俊. 雷公藤多苷临床应用及不良反应的研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(20):2185-2190.
- [38] 李金洋,李军,王君明,等. 雷公藤多苷致肝毒及其减毒的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(17):4359-4361.
- [39] 刘春芳,张晶璇,李逸群,等. 6个不同厂家雷公藤多苷片致小鼠急性肝损伤的比较研究及机制探索[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16):3494-3501.
- [40] 韦敏,李波,王跃峰,等. 龙胆苦苷通过抑制TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路减轻小鼠急性肝损伤的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(22):76-83.
- [41] 赵秀楠,高瑜. 病毒性肝炎检测AST与ALT比值的临床意义[J]. 临床检验杂志:电子版, 2017, 6(3):585-586.
- [42] 何鸿雁,李华,杨艳,等. 青果葛根配伍液对醉酒大鼠肝脏损伤的保护作用研究[J]. 医学理论与实践, 2015, 28(12):1541-1543.
- [43] GIANNINI E G, TESTA R, SAVARINO V. Liver enzyme alteration: A guide for clinicians [J]. CMAJ, 2005, 172(3):367-379.
- [44] 舒远辉,马润,谢娜,等. 大麻二酚通过激活PPAR- γ 减轻四氯化碳所致小鼠急性肝损伤[J]. 天津医药, 2021, 49(7):694-698.
- [45] 晏之谦,张妮,肖芳,等. 雷公藤配伍白芍调控氧化应激水平的肝脏减毒效应研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(5):1042-1046.
- [46] 周文静,柴智,王永辉,等. 归脾汤对雷公藤醇提取物致肝损伤大鼠肝微粒体CYP3A4酶活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(6):113-116.
- [47] 杨新华,夏宏光,金涌. 雷公藤甲素通过抑制细胞色素P4503A4酶增强肝损伤研究[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(4):496-502.
- [48] 王呈谕,李登科,全正扬,等. 基于细胞色素氧化酶CYP2D6的何首乌肝细胞毒性及相关成分研究[J]. 中国药物警戒, 2021, 18(3):220-227, 239.
- [49] 夏军,樊宝才,谢文明,等. 雷公藤多苷片对大鼠药物代谢酶CYP2E1和CYP3A4活性的影响[J]. 中国药师, 2012, 15(11):1529-1532.
- [50] 李媛媛,王一旭,王浩,等. 逍遥散防治雷公藤多苷致肝损伤的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(23):76-82.
- [51] 申保生,高海丽,宋新文. 复方甘草酸苷对慢性乙型肝炎患者血清肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-6的影响[J]. 中国药房, 2006, 17(21):1646-1647.
- [52] 李晗,张广平,杨依靠,等. 基于药物代谢酶CYP3A4的乌头碱配伍人参皂苷、甘草苷的减毒机制研究[J]. 药物评价研究, 2020, 43(2):199-205.

[责任编辑 孙丛丛]