

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.15.017

逍遥散对雷公藤致急性肝损伤大鼠肝脏组织 Bcl-2、Bax 蛋白表达及 Caspase-3 活性的影响

柴智¹, 樊慧杰¹, 周文静¹, 马艳苗¹, 李彦艳², 张波³, 周然^{*}

(1. 山西中医药大学基础医学院, 山西省晋中市高校园区大学街 121 号, 030619; 2. 山西中医药大学附属医院; 3. 山西职工医学院)

摘要 目的 探讨逍遥散防治雷公藤致急性肝损伤的可能作用机制。方法 30 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、逍遥散组, 每组 10 只。逍遥散组大鼠造模前 4 天灌胃逍遥散 6.75 g/(kg·d), 正常组和模型组给予等体积蒸馏水, 每天 1 次。第 5 天模型组和逍遥散组大鼠灌胃雷公藤水煎剂 3.75 g/(kg·d) 连续 4 天, 建立大鼠急性肝损伤模型。比较各组大鼠肝脏指数及血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 水平, 检测肝脏组织 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2) 和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 蛋白表达及天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) 活性。结果 与正常组比较, 模型组大鼠的肝脏指数和血清 ALT、AST 水平明显升高, 肝脏组织 Bcl-2 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 值明显下降, Bax 蛋白表达和 Caspase-3 活性明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 逍遥散组大鼠的肝脏指数和血清 ALT、AST 水平明显降低, 肝脏组织 Bcl-2 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 值明显升高, Bax 蛋白表达和 Caspase-3 活性明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 逍遥散对雷公藤致大鼠急性肝损伤的防控作用可能与其上调肝脏组织 Bcl-2 蛋白水平和下调 Bax 蛋白水平、Caspase-3 活性, 从而改善肝细胞凋亡有关。

关键词 雷公藤; 逍遥散; 急性肝损伤; 细胞凋亡

雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.) 系卫矛科雷公藤属一年生藤本植物, 又名断肠草、黄藤根等^[1]。中医学认为该药性凉, 味辛、苦, 有大毒, 归肝、肾经, 具有祛风除湿、活血通络、消肿止痛、杀虫解毒等功效^[2]。雷公藤在临床上治疗类风湿性关节炎、慢性肾炎、系统性红斑狼疮等疾病效果显著, 但同时表现出明显的毒副作用, 其所致肝损伤在相关文献报道中居单味肝损伤中药的首位^[3-4]。这给其临床应用带来很大阻力, 所以对雷公藤减毒方面的研究就显得非常重要。前期研究表明, 逍遥散对雷公藤引起的肝损伤具有显著的防治作用^[5-6]。本实验进一步探讨雷公藤所致急性肝损伤的发生机制及逍遥散的可能作用机制。

1 材料

1.1 动物

清洁级 SD 大鼠 30 只, 5 周龄, 雌雄各半, 体

重 (110 ± 10) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物许可证号 SCXK (京) 2011-0011。在室温 (22 ± 2) °C、湿度 45% ~ 55% 环境中雌雄分笼饲养, 按昼夜节律自然照明, 自由进食进水, 适应性饲养 1 周。

1.2 药品

雷公藤饮片 (批号: 141103), 购自北京同仁堂饮片有限责任公司。逍遥散组成: 北柴胡 30 g, 当归 30 g, 白芍 30 g, 白术 30 g, 茯苓 15 g, 炙甘草 15 g, 生姜 10 g, 薄荷 10 g, 购自北京同仁堂饮片有限责任公司。

1.3 主要试剂及仪器

丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 试剂盒 (批号: C009)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 试剂盒 (批号: C010) 均购自南京建成生物工程研究所; B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2) 单克隆抗体 (批号: sc-7382)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 单克隆抗体 (批号: sc-20067)、Actin 抗体 (批号: sc-58673)、羊抗鼠二抗 (批号: sc-2005) 均购自美国 Santa Cruz 公司; 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋

基金项目: 山西省基础研究项目 (2012021031-6); 山西省卫生计生委科研课题 (2014096); 山西中医药大学重点科技创新团队 (20150401)

* 通讯作者: zhour58@sohu.com, (0351) 3179702

白酶-3 (Caspase-3) 活性检测试剂盒 (批号: ab39401) 购自美国 Abcam 公司。

Hei-VAP 旋转蒸发仪 (德国 Heidolph 集团); LR4001 RM-2015 石蜡切片机 (德国 Leica 公司); IX51 光学显微镜 (日本 Olympus 公司); Spectra-Max 190 全波长酶标仪 (美国 MD 公司); Mini-PROTEAN Tetra 垂直电泳槽、DYC40C 半干式碳板转印槽、HOOD-II 凝胶成像分析仪, 美国 Bio-Rad 公司; 3k30 台式高速冷冻离心机 (德国 Sigma 公司); EX1103ZH 电子天平 (美国 OHAUS 公司)。

1.4 动物分组及干预方法

将 30 只大鼠采用随机数字表法分为正常组、模型组、逍遥散组, 每组 10 只。逍遥散组在造模前 4 天连续给予逍遥散 6.75 g/(kg·d) 灌胃 (成人用药量的等效剂量)^[7], 正常组和模型组给予等体积的蒸馏水, 均每天 1 次。第 5 天起模型组和逍遥散组连续 4 天灌胃雷公藤水煎剂 3.75 g/(kg·d) 建立大鼠急性肝损伤模型^[8], 正常组灌胃 20 ml/kg 蒸馏水。

1.5 检测指标及方法

1) 于末次灌胃雷公藤水煎剂后禁食 12 h, 以 5% 水合氯醛麻醉后称取各组大鼠体质量, 处死大鼠, 取肝脏称取肝质量, 计算肝脏指数 (肝脏指数 = 肝脏质量/大鼠体质量 × 100%); 2) 腹腔静脉取血, 3000 r/min 离心 5 min 制备血清, 采用干化学法测定血清 ALT、AST 的活力; 3) 提取肝组织总蛋白, 采用 Western-blotting 法检测肝脏 Bcl-2、Bax 蛋白水平; 4) 称取一定量肝组织, 加入裂解液制备组织匀浆, 按照试剂盒说明书操作步骤, 采用分光光度法在 405 nm 检测肝匀浆上清液的 OD 值反映 Caspase-3 活性。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 计量资料采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较应用单因素方差分析。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肝脏指数及血清 ALT、AST 水平比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组大鼠肝脏指数和血清 ALT、AST 水平明显升高 (P < 0.01); 与模型组比较, 逍遥散组大鼠肝脏指数和血清 ALT、AST 水平均明显降低 (P < 0.01); 与正常组比较, 逍遥散组大鼠肝脏指数和血清 ALT、AST 水平差异无统计学意义 (P > 0.05)。

表 1 各组大鼠肝脏指数及血清 ALT、AST 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	肝脏指数 (%)	ALT (U/L)	AST (U/L)
正常组	10	3.53 ± 0.29	36.71 ± 4.27	109.46 ± 14.71
模型组	10	4.13 ± 0.32*	63.97 ± 5.04*	192.59 ± 27.44*
逍遥散组	10	3.56 ± 0.28 [△]	38.73 ± 4.63 [△]	120.17 ± 18.75 [△]

注: ALT, 丙氨酸氨基转移酶; AST, 门冬氨酸氨基转移酶; 与正常组比较, * P < 0.01; 与模型组比较, [△] P < 0.01

2.2 各组大鼠肝脏组织 Bcl-2、Bax 蛋白表达比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组大鼠肝脏组织 Bcl-2 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 值明显下降, Bax 蛋白表达明显升高 (P < 0.01); 与模型组比较, 逍遥散组大鼠肝脏组织 Bax 蛋白表达明显下降, Bcl-2 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 值明显升高 (P < 0.01)。与正常组比较, 逍遥散组大鼠肝脏组织 Bcl-2、Bax 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 值差异无统计学意义 (P > 0.05)。各组大鼠肝脏组织 Bcl-2、Bax 蛋白电泳图见图 1。

表 2 各组大鼠肝脏组织 Bcl-2、Bax 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Bcl-2/Actin	Bax/Actin	Bcl-2/Bax
正常组	10	0.60 ± 0.09	0.72 ± 0.05	0.85 ± 0.08
模型组	10	0.31 ± 0.04*	1.28 ± 0.17*	0.26 ± 0.03*
逍遥散组	10	0.56 ± 0.11 [△]	0.77 ± 0.08 [△]	0.81 ± 0.07 [△]

注: Bcl-2, B 细胞淋巴瘤/白血病 2; Bax, Bcl-2 相关 X 蛋白; 与正常组比较, * P < 0.01; 与模型组比较, [△] P < 0.01



注: Bcl-2, B 细胞淋巴瘤/白血病 2; Bax, Bcl-2 相关 X 蛋白

图 1 各组大鼠肝脏组织 Bcl-2、Bax 蛋白电泳图

2.3 各组大鼠肝脏组织 Caspase-3 活性比较

表 3 示, 与正常组比较, 模型组大鼠肝脏组织

表 3 各组大鼠肝脏组织 Caspase-3 活性比较 (OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Caspase-3
正常组	10	1.25 ± 0.28
模型组	10	4.57 ± 0.47*
逍遥散组	10	1.53 ± 0.26 [△]

注: Caspase-3, 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3; 与正常组比较, * P < 0.05; 与模型组比较, [△] P < 0.05

Caspase-3 活性明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 逍遥散组大鼠肝脏 Caspase-3 活性明显下降 ($P < 0.05$); 与正常组比较, 逍遥散组大鼠肝脏 Caspase-3 活性差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

在临床上, 雷公藤的毒副作用特别是肝损伤倍受人们关注, 但对其的研究一直未取得突破性进展, 亦缺乏有效的防控手段^[1]。近年来研究发现, 凋亡途径在药物性肝损伤发病过程中起着重要的作用, 中药复方可通过抑制肝细胞凋亡而在一定程度上防控药物性肝损伤^[2]。前期研究表明, 逍遥散对雷公藤引起的急性肝损伤具有较好的防控作用, 其机制与抑制脂质过氧化和炎症反应有关^[3-4]。关于雷公藤造成肝损伤的中医病机, 乃为外来之药邪侵入机体, 首先戕伐脾胃, 致脾虚不运, 气血生化无源, 肝藏血不足, 进而影响肝的疏泄功能, 致肝(胆)脾(胃)不和; 或外来之药邪直接损害肝胆, 致使肝脏疏泄功能障碍, 影响胆汁的排泄, 形成黄疸、肝炎、肝脏肿大等症状。逍遥散具有疏肝解郁、养血健脾之功效, 主治肝郁血虚脾弱证。方中柴胡疏肝解郁, 当归、白芍养血柔肝, 三药配合, 既补肝体又和肝用, 为君药; 白术、茯苓调中补脾, 生姜温胃和中, 三者合用能健脾以化气血, 强脾以防肝乘, 为臣药; 再以薄荷解郁, 炙甘草调和诸药, 共为佐药。诸药配合, 既补肝体, 又疏肝用, 既养血又健脾, 气血兼顾, 肝脾并治, 为调和肝脾之名方。

肝细胞的异常凋亡是肝炎等许多肝脏疾病的重要病理变化之一, 既可直接引起肝细胞数量减少, 也可引起继发性的肝细胞坏死和肝内炎症, 进而影响肝细胞数量和功能, 所以调控肝细胞的异常凋亡可以保护受损肝脏^[11-12]。线粒体内源性凋亡通路是哺乳动物细胞凋亡的主要途径, Bcl-2 家族是线粒体凋亡途径中重要的调节因子^[13], 其中 Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 家族中两个主要成员, 二者可通过形成同源或异源二聚体来调节细胞凋亡, 当 Bcl-2 蛋白或其同源二聚体占优势时, 细胞凋亡就会被抑制; 当 Bax 蛋白或其同源二聚体占优势时, 细胞凋亡就会被诱导^[14]。线粒体内部释放的 Caspase-3 直接参与了凋亡信号的转导, 可被环境改变、DNA 损伤等多种因素诱发^[15]。

本实验发现, 雷公藤造成大鼠急性肝损伤时, 可明显下调肝脏组织 Bcl-2 蛋白表达和 Bcl-2/Bax

比值, 上调 Bax 蛋白表达和 Caspase-3 活性, 说明雷公藤引起大鼠急性肝损伤与其调控线粒体凋亡途径有关, 这可能是雷公藤致大鼠急性肝损伤的机制之一。当在雷公藤造模前提前给予逍遥散时, 逍遥散可明显上调肝脏组织 Bcl-2 蛋白表达和 Bcl-2/Bax 值, 下调肝脏组织 Bax 蛋白表达和 Caspase-3 活性, 说明逍遥散可以通过反向调节雷公藤引起的线粒体凋亡途径, 从而降低肝脏指数、改善肝功能损伤, 起到防控肝脏受损的作用。

参考文献

- [1] 罗素花, 付小梅, 杨瑞昆, 等. 雷公藤药材质量标准研究 [J]. 江西中医药, 2017, 48(10): 68-70.
- [2] 李德平, 翟华强, 曹伟, 等. 雷公藤的药性文献回顾及其作用机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13): 299.
- [3] 张鑫. 雷公藤制剂毒副作用及减毒方法研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(22): 1897-1901.
- [4] 曹玲娟, 颜苗, 李焕德, 等. 雷公藤致肝损伤及与甘草配伍减毒机制的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(13): 2537-2541.
- [5] 柴智, 周文静, 王永辉, 等. 逍遥散对雷公藤致大鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 170-172.
- [6] 柴智, 樊慧杰, 周文静, 等. 逍遥散对雷公藤致急性肝损伤大鼠 CD68、肿瘤坏死因子 α 的影响 [J]. 中医杂志, 2014, 55(6): 497-499.
- [7] XIN JW, JIANG YG. Long noncoding RNA MALAT1 inhibits apoptosis induced by oxygen-glucose deprivation and reoxygenation in human brain microvascular endothelial cells [J]. Exp Ther Med, 2017, 13(4): 1225-1234.
- [8] 柴智, 王永辉, 李艳彦, 等. 雷公藤致大鼠急性肝损伤模型的制备 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(3): 8-11.
- [9] 张静, 江莹, 王芳, 等. 基于“异类相制”理论探讨雷公藤肝毒性配伍减毒的作用 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2711-2715.
- [10] 田静, 杨庆芳, 金巧菲, 等. 茵陈蒿颗粒对四氯化碳致急性肝损伤大鼠 TNF- α 及细胞凋亡的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 19(23): 175-178.
- [11] WANG K. Autophagy and apoptosis in liver injury [J]. Cell Cycle, 2015, 14(11): 1631-1642.
- [12] LUEDDE T, KAPLOWITZ N, SCHWABE RF. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance [J]. Gastroenterology, 2014, 147(4): 765-783.
- [13] HENNESSY EJ. Selective inhibitors of Bcl-2 and Bcl-xL: Balancing antitumor activity with on-target toxicity [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2016, 26(9): 2105-2114.

- [4] LI MX, DEWSON G. Mitochondria and apoptosis: emerging concepts [J]. F1000Prime Rep, 2015, 7: 42. doi: 10.12703/P7-42. eCollection 2015.
- [5] ATERGNANI S, MISSIROLI S, MARCHI S, et al. Mito-

chondria-associated endoplasmic reticulum membranes microenvironment: targeting autophagic and apoptotic pathways in cancer therapy [J]. Front Oncol, 2015, 5: 173. doi: 10.3389/fonc.2015.00173.

Effects of Xiaoyao Powder (逍遥散) on Bcl-2, Bax Protein Expression and Caspase-3 Activity in Liver Tissue of Rats with Acute Liver Injury Caused by Tripterygium Wilfordii (雷公藤)

CHAI Zhi¹, FAN Huijie¹, ZHOU Wenjing¹, MA Yanmiao¹, LI Yanyan², ZHANG Bo³, ZHOU Ran¹

(1. School of Basic Medicine, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619; 2. Affiliated Hospital of Shanxi University of Chinese Medicine; 3. Shanxi Medical College of Staff and Workers)

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of Xiaoyao Powder (逍遥散) in preventing and treating acute liver injury induced by Tripterygium Wilfordii (雷公藤). **Methods** A total of 30 SD rats were randomly divided into normal group, model group and Xiaoyao Powder group, with 10 rats in each group. In the Xiaoyao Powder group, the rats were given intragastric administration of 6.75 g/(kg · d) of Xiaoyao Powder for 4 days before modeling, and the normal group and the model group were given an equal volume of distilled water once a day. Rat model of acute liver injury was established in the model group of Day 5 and Xiaoyao Powder group by intragastric administration of Tripterygium wilfordii decoction 3.75 g/(kg · d) for 4 consecutive days. Liver index and serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels were compared between the groups, and the expression of B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) and Bcl-2 related X protein (Bax) protein in the liver tissue and cysteine-containing aspartate-specific proteases 3 (Caspase-3) activity were detected. **Results** Compared with the normal group, the liver index and serum ALT and AST levels in the model group were significantly increased. The expression of Bcl-2 protein and Bcl-2/Bax in liver tissue decreased significantly, and Bax protein expression and Caspase-3 activity increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); compared with the model group, liver index and serum ALT and AST levels were significantly decreased in Xiaoyao Powder group, and Bcl-2 protein expression and Bcl-2/Bax values ?? in liver tissue were significantly increased. Bax protein expression and Caspase-3 activity were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The prevention and control effect of Xiaoyao Powder on acute liver injury induced by Tripterygium wilfordii may be related to the up-regulation of Bcl-2 protein level in liver tissue, down-regulation of Bax protein level and Caspase-3 activity, and thus to improve hepatocyte apoptosis.

Keywords Tripterygium wilfordii; Xiaoyao Powder; acute liver injury; apoptosis

(收稿日期: 2018-01-15; 修回日期: 2018-04-02)

编辑: 邓 媛

第九届国际中医妇科学术大会参会通知 (第一轮征文)

由世界中医药学会联合会妇科专业委员会主办, 湖北福人药业股份有限公司协办的“第九届国际中医妇科学术大会”, 以“生殖障碍性疾病及妇科炎症性病变中医诊疗研究”为主题, 拟定于2018年11月在湖北省举行, 届时将举办妇科炎症性病变中医诊疗高级论坛, 同时邀请国内外著名妇科专家进行专题学术讲座, 并设“福人杯”金刚藤胶囊有奖征文活动, 评选优秀学术论文。现将有关事项通知如下:

一、征文内容: 1. 名老中医对妇科炎症及生殖障碍性疾病的诊疗方案及学术经验; 2. 妇科炎症及生殖障碍性疾病的中医诊治优势及其特色疗法; 3. 新技术、新疗法在诊治妇科炎症及生殖障碍性疾病中的应用及最新研究进展; 4. 医家诊治妇科炎症及生殖障碍性疾病经验挖掘与文献整理; 5. 金刚藤胶囊组方研究、药理作用及临床应用; 6. 金刚藤胶囊药效基础及安全性观察; 7. 金刚藤胶囊深层次开发思路及远景规划。

二、征文要求: 1. 论文要求主题鲜明, 论据充分, 内容详实, 文责自负。2. 每篇论文均以 word 格式投稿, 全文篇幅 4000 字左右。3. 所有论文一律采用电子投稿 (fkfh189@163.com), 请自留底稿, 恕不退稿。

三、特别提示: 1. 本次征文一经选用, 即收入学术大会论文集。2. 会期评选优秀学术论文, 颁发“福人杯”金刚藤胶囊有奖征文一、二、三等奖奖金及证书。3. 论文投稿截止日期: 2018 年 9 月 30 日。

四、会议负责人及联系方式: 刘丹卓: 13787132521, fkfh189@163.com; 通讯地址: 410007, 湖南省长沙市雨花区韶山中路 113 号湖南中医药大学