

• 药理与临床 •

细胞凋亡在雷公藤甲素所致大鼠急性肾损伤中的作用及其发生机制

杨帆¹, 任亮¹, 卓苹¹, 李上勋¹, 刘良^{1,2*}

1. 华中科技大学同济医学院 法医学系, 湖北 武汉 430030

2. 中国政法大学 证据科学教育部重点实验室, 北京 100040

摘要: **目的** 观察雷公藤甲素所致大鼠急性肾损伤情况, 研究细胞凋亡在雷公藤甲素所致大鼠急性肾损伤中的作用及其发生机制。**方法** 大鼠分别单次 ip 给予雷公藤甲素 1、2 mg/kg, 给药后 48 h 心脏采血, 检测血浆尿素氮 (BUN) 与肌酐 (Scr) 水平; 肾脏 HE 染色, 光镜下观察肾组织形态学改变; 应用原位末端转移酶标记法 (TUNEL) 检测肾组织细胞凋亡情况; 利用免疫组织化学染色法结合计算机图像分析技术检测肾组织内凋亡相关蛋白的表达情况, 并利用 RT-PCR 技术测定肾组织内凋亡相关蛋白调控基因的表达。**结果** 雷公藤甲素 2 个剂量组均可见大量肾小管上皮细胞凋亡, 且高剂量的作用显著大于低剂量, 细胞凋亡与肾功能改变相关; 肾组织中 Bax、Bid、Bad、Fas 以及 FasL 蛋白表达明显增多, 且呈剂量依赖性, 而 Bcl-2 的表达未见明显改变。**结论** 一次性 ip 大剂量雷公藤甲素会在短时间 (48 h) 内造成严重的肾损伤, 肾小管上皮细胞凋亡是雷公藤甲素所致大鼠急性肾损伤的重要组织学基础之一, 且 Bcl-2 家族以及 Fas/FasL 在雷公藤甲素诱导的肾小管上皮细胞凋亡的过程中起重要作用。

关键词: 雷公藤甲素; 肾损伤; 细胞凋亡; 凋亡相关蛋白; Bcl-2 家族**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2011)05-0923-06

Role of apoptosis in triptolide-induced acute nephrotoxicity and possible mechanisms in rats

YANG Fan¹, REN Liang¹, ZHUO Luo¹, LI Shang-xun¹, LIU Liang^{1,2}

1. Forensic Medicine Department, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

2. Key Laboratory of Evidence Science (China University of Political Science and Law), Ministry of Education, Beijing 100040, China

Abstract: **Objective** To investigate the role of apoptosis in triptolide-induced acute nephrotoxicity and the possible mechanisms *in vivo*. **Methods** Thirty male SD rats were randomly divided into control and two testing groups. The rats of two testing groups were ip injected with triptolide solution at doses of 1 and 2 mg/kg of body weight, respectively, and the rats of the control group were ip injected with 0.9% physiological saline instead. Testing rats were killed 48 h after the injection; Blood samples were collected and both kidneys were removed. The BUN and Scr concentrations in plasma were measured, and renal histology was examined by HE staining. TUNEL staining was performed to evaluate apoptosis of renal tissue. Renal expression of apoptosis related proteins Bcl-2, Bax, Bid, Bad, Fas, and FasL proteins, as well as corresponding regulating genes were assessed by immuno-histochemical staining and real-time PCR. **Results** After injection, a large number of apoptotic tubular cells appeared corresponding to the increases of BUN and Scr concentrations. Furthermore, increased expression of Bax, Bid, Bad, Fas, and FasL was detected at both protein and mRNA levels, but the expression of Bcl-2 did not differ among the three groups. **Conclusion** These results suggest that apoptosis of tubular cells plays a key role in the pathogenesis of triptolide-induced acute nephrotoxicity, and Bcl-2 family, as well as Fas and FasL, is involved in this process.

Key words: triptolide; nephrotoxicity; apoptosis; apoptosis-related protein; Bcl-2 family

卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. (triptolide) 是其主要成分之一^[1]。许多研究均已证明, 雷公藤甲素有多种药理作用, 如免疫抑制、抗 f. 中的主要活性成分为二萜类化合物, 雷公藤甲素

收稿日期: 2010-08-22

作者简介: 杨帆 (1981—), 男, 湖北京山人, 博士, 主要从事法医学病理学、毒理学研究。Tel: 13507198617 E-mail: t0170051@yahoo.com.cn

*通讯作者 刘良

炎、抗肿瘤、抗生育等^[2-6]。已有多种含雷公藤甲素的雷公藤提取物或制剂用于临床,并取得了良好疗效^[7-8]。然而,雷公藤甲素有毒性,对消化系统、泌尿系统、血液循环系统、生殖系统以及骨髓产生不同程度的损伤,影响了其临床应用^[9-10]。在所有雷公藤甲素中毒致死的案例中,急性肾功能衰竭是最主要的死亡原因^[11],而且肾脏是雷公藤甲素慢性毒性作用最重要的靶器官^[12]。因此,早期检测肾损伤,探讨肾损伤机制是目前药物研究的热点^[13-14]。然而到目前为止,尚不清楚雷公藤甲素所致肾损伤的机制。在本研究中,通过建立雷公藤甲素致大鼠急性肾损伤模型,研究细胞凋亡在雷公藤甲素急性肾毒性中的作用,并通过检测 Bcl-2、Bax、Bid、Bad、Fas 以及 FasL 蛋白的表达水平,探讨细胞凋亡发生的机制。

1 材料

1.1 药品

雷公藤甲素(批号 111567-200502),质量分数为 99.99%,购自中国药品生物制品检定所。用少量二甲基亚砜将其溶解制成母液,储存于 -20°C 冰箱内。使用前,用生理盐水稀释至所需浓度。

1.2 试剂

原位末端转移酶标记法(TUNEL)试剂、SABC 试剂盒,博士德公司产品;实时 PCR 检测试剂,日本 Toyobo 公司产品。

1.3 动物

健康雄性 SD 大鼠,30 只,体质量 180~220 g,购自华中科技大学同济医学院实验动物中心,合格证号 00003552。

2 方法

2.1 动物模型的建立

大鼠饲养在洁净无尘的环境中,温度 18~22 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 55%,光照 12 h,饲料由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。将大鼠随机分为对照组和雷公藤甲素低、高剂量组,每组 10 只。雷公藤甲素低、高剂量组大鼠分别单次 ip 雷公藤甲素 1、2 mg/kg (LD_{50} 为 1 mg/kg),对照组则 ip 等量的生理盐水。

2.2 生化指标测定

给药 48 h 后,颈椎脱臼法处死大鼠,抽取心脏血液,并取出双侧肾脏。血液样本中加入抗凝剂抗凝,1 500 r/min 离心 10 min,收集血浆。利用全自动生化分析仪测定血尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)

水平,以监测大鼠肾功能改变。

2.3 组织病理学检查

取肾组织标本,经 4%多聚甲醛固定并用石蜡包埋,制作石蜡切片,经 HE 染色后在光镜($\times 400$)下观察各组肾组织病理改变情况,利用 ATN score 评分法则对雷公藤甲素所致的肾小管损伤程度进行半定量分析^[15]。

2.4 肾组织细胞凋亡检测

采用 TUNEL 试剂盒,根据说明书进行操作。核着棕黄色者为阳性细胞,即凋亡细胞。每张切片随机选择 15 个高倍视野,计数视野中阳性细胞数,并计算凋亡系数(apoptotic index, AI, AI=阳性细胞数/视野中总的有核细胞数)^[15]。

2.5 免疫组织化学染色

取肾组织石蜡切片脱蜡置水,入 1 g/L 的 TBS 中行微波抗原修复 10 min,滴加抗原修复液作用 15 min,3% H_2O_2 作用 15 min 灭活内源性酶,0.01 mol/L 的 PBS 冲洗后,每片分别滴加 Bcl-2、Bax、Bid、Bad、Fas 及 FasL 抗体(Santa Cruz 公司)50 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 24 h。按 SABC 试剂盒说明操作,DAB 显色,封片,观察。

2.6 凋亡相关蛋白半定量分析

应用计算机图像分析技术对肾组织中凋亡相关蛋白的表达进行半定量分析。在上述每张免疫组织化学染色切片中,随机选取 15 个高倍视野,利用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件计算阳性细胞率(视野中阳性细胞数/总的有核细胞数)作为相应蛋白表达的相对量^[15]。

2.7 实时 PCR 检测

严格按照试剂相关说明进行操作。所用引物序列、GenBank 登录号、基因片段长度及退火温度情况见表 1。

2.8 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对数据进行方差分析(ANOVA)与 Bonferroni test 分析。

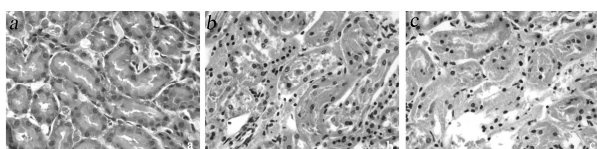
3 结果

3.1 雷公藤甲素对大鼠肾组织病理形态的影响

HE 染色显示,一次性大剂量 ip 雷公藤甲素(1、2 mg/kg)在短时间(48 h)内导致大鼠肾脏严重损伤:肾小管上皮细胞空泡变性(基底膜侧),局灶性肾小管上皮细胞坏死、脱落,肾小管管腔狭窄,可见胞浆脱落物质,ip 剂量越大,肾小管损伤范围越大,见图 1。ATN score 半定量分析显示,雷公藤甲

表1 实时PCR引物
Table 1 Primers for real-time PCR

基因	GenBank 登录号	正向引物	反向引物	片段长度/bp	退火温度/℃
bcl-2	NM_016993	TTTGATTTCCTGGCTGTCT	CTGATTGACCAATTGCCTG	282	56
bax	NM_017059.1	CATTGACACCAAAGAGTACGC	TGTTGATGAATCTCAGCAGGA	206	60
bid	NM_022684.1	GCTGGTGTTCGGCTTTCTC	CAGTGTGGGCTGGATGCT	262	60
bad	NM_022698.1	CAGGCAGCCAATAACAGTCATC	GCTAAGCTCCTCCTCCATCC	114	60
fas	NM_139194.2	GTGATGAAGGGCATGGTTTAG	GCATTTGGTGTGCTGGTT	179	58
fasL	NM_012908	ACCACCTCCATCACCCTACC	CATTCCAACCAGAGCCACC	136	58
β -actin	NM_031144	CGTTGACATCCGTAAAGACCTC	TAGGAGCCAGGGCAGTAATCT	110	58



对照 雷公藤甲素 1 mg·kg⁻¹ 雷公藤甲素 2 mg·kg⁻¹

图1 雷公藤甲素致急性肾损伤大鼠肾组织 HE 染色

Fig. 1 HE staining of renal tissue in rats with triptolide-induced acute nephrotoxicity

素对肾小管的损伤呈明显的剂量依赖性 ($P < 0.01$), 见表2。

3.2 雷公藤甲素对大鼠肾功能的影响

与对照组比较, ip 雷公藤甲素 1、2 mg/kg 后, 血中 Scr 与 BUN 显著升高 ($P < 0.01$), 且呈明显的剂量依赖性。见表2。

3.3 雷公藤甲素对大鼠肾组织细胞凋亡的影响

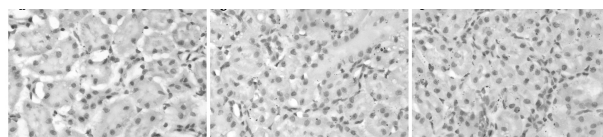
表2 雷公藤甲素对大鼠肾组织结构与肾功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of triptolide on renal tissue structure and function in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ATN score	Scr/(μ mol·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)	AI/%
对照	—	0	20.16 $\pm$ 1.46	6.15 $\pm$ 0.50	10.05 $\pm$ 0.84
雷公藤甲素	1	1.60 $\pm$ 0.55 ^{▲▲}	34.70 $\pm$ 3.16 ^{▲▲}	7.98 $\pm$ 0.06 ^{▲▲}	48.28 $\pm$ 4.95 ^{▲▲}
	2	2.80 $\pm$ 0.84 ^{**}	54.70 $\pm$ 3.16 ^{**}	10.09 $\pm$ 0.43 ^{**}	73.73 $\pm$ 4.14 ^{**}

与对照组比较: ^{▲▲} $P < 0.01$; 与雷公藤甲素 1 mg·kg⁻¹ 组比较: ^{**} $P < 0.01$

^{▲▲} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs triptolide 1 mg·kg⁻¹ group



对照 雷公藤甲素 1 mg·kg⁻¹ 雷公藤甲素 2 mg·kg⁻¹

图2 TUNEL 检测雷公藤甲素对肾小管上皮细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effects of triptolide on renal tubular apoptosis by TUNEL

对照组可见少量的凋亡的肾小管上皮细胞, 大鼠 ip 雷公藤甲素 1、2 mg/kg 后, 肾小管上皮细胞凋亡数量明显增加, 与对照组相比, AI 值显著升高, 且呈明显的剂量依赖性 ($P < 0.01$)。见图2和表2。另外, 各组均未见肾小球发生细胞凋亡。

3.4 雷公藤甲素对肾小管上皮细胞 Bcl-2 家族蛋白表达的影响

对照组 Bcl-2 蛋白在肾小管上皮细胞中有中等强度的表达, 而在 ip 雷公藤甲素 1、2 mg/kg 后, 肾小管 Bcl-2 蛋白表达未见明显改变, 见图3。计算机图像分析软件检测显示, 各组间阳性细胞率无明显差别 ($P > 0.05$, 表3), 提示 ip 雷公藤甲素后, 肾小管上皮细胞中 Bcl-2 蛋白表达量无明显变化。与之不同的是, 对照组促凋亡蛋白 Bax、Bid 与 Bad 的表达强度较弱; 而在 ip 雷公藤甲素 1、2 mg/kg

后, 肾小管上皮细胞中 Bax、Bid、Bad 蛋白表达明显增强 (图3), 相应的阳性细胞率以明显的剂量依赖方式升高 ($P < 0.01$, 表3)。此外, ip 雷公藤甲素后, Bax 与 Bcl-2 蛋白表达量的比值也以明显的剂量依赖方式呈上升趋势 ($P < 0.01$): 在对照组中, Bax/Bcl-2 值只有 0.38 ± 0.02 , 而雷公藤甲素 1、2 mg/kg 组分别升至 0.95 ± 0.04 、 1.70 ± 0.11 。

3.5 雷公藤甲素对肾小管上皮细胞 Fas 和 FasL 蛋白表达的影响

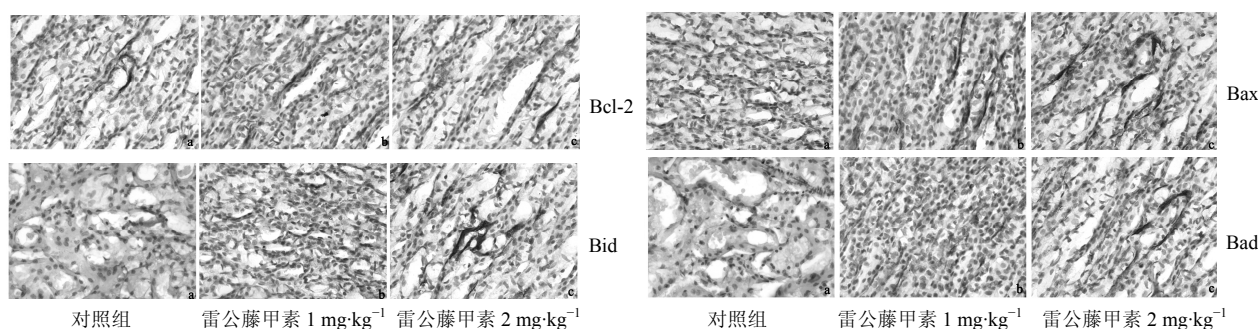


图3 雷公藤甲素对肾小管上皮细胞 Bcl-2 家族蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of triptolide on expression of Bcl-2 family proteins in renal tissue

表3 雷公藤甲素诱导的肾损伤大鼠肾组织凋亡相关蛋白表达半定量结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 Positive rates of apoptosis-related proteins in renal tissue of triptolide-induced renal injury rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	阳性细胞率/%					
		Bcl-2	Bax	Bid	Bad	Fas	FasL
对照	—	28.42±0.54	10.80±0.46	9.41±0.55	11.32±0.46	9.78±0.53	7.84±0.58
雷公藤甲素	1	28.54±1.23	27.01±0.96 ^{▲▲}	23.47±1.75 ^{▲▲}	30.51±1.30 ^{▲▲}	23.34±1.38 ^{▲▲}	25.96±0.89 ^{▲▲}
	2	28.69±1.27	48.56±2.18 ^{**}	31.72±1.84 ^{**}	43.58±2.08 ^{**}	34.06±1.10 ^{**}	41.80±1.11 ^{**}

对照组比较: ^{▲▲} $P < 0.01$; 与雷公藤甲素 1 mg·kg⁻¹ 组比较: ^{**} $P < 0.01$

^{▲▲} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs triptolide 1 mg·kg⁻¹ group

与 Bcl-2 家族中的促凋亡蛋白情况相似, Fas 与 FasL 蛋白在对照组大鼠肾小管上皮细胞中也有少量表达 (图 4); 而在 ip 雷公藤甲素 1、2 mg/kg

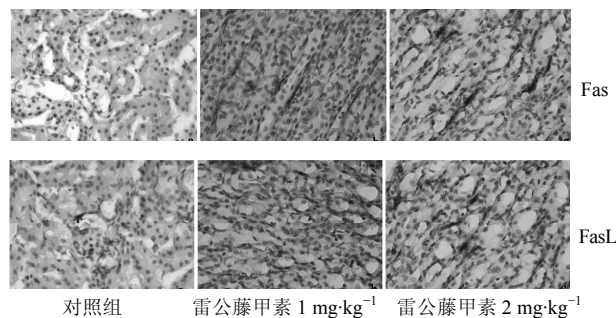


图4 雷公藤甲素对肾小管上皮细胞 Fas、FasL 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of triptolide on expression of Fas and FasL proteins in renal tubular epithelial cells

表4 雷公藤甲素对肾脏中 bcl-2、bax、bid、bad、fas、fasL mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 Effect of triptolide on mRNA expression of bcl-2, bax, bid, bad, fas, and fasL ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	bcl-2	bax	bid	bad	fas	fasL
对照	—	1.02±0.37	1.02±0.26	1.01±0.17	1.04±0.35	1.01±0.14	1.02±0.18
雷公藤甲素	1	1.00±0.30	2.55±0.13 ^{▲▲}	2.44±0.09 ^{▲▲}	2.64±0.17 ^{▲▲}	2.49±0.20 ^{▲▲}	2.57±0.18 ^{▲▲}
	2	1.01±0.26	3.71±0.19 ^{**}	3.32±0.40 ^{**}	3.61±0.23 ^{**}	4.29±0.50 ^{**}	3.65±0.19 ^{**}

与对照组比较: ^{▲▲} $P < 0.05$; 与雷公藤甲素 1 mg·kg⁻¹ 组比较: ^{**} $P < 0.01$

^{▲▲} $P < 0.05$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs triptolide 1 mg·kg⁻¹ group

后, Fas 与 FasL 蛋白表达明显增强 (图 4), 且呈明显的剂量依赖性, Fas 的阳性细胞率分别增加约 1.4、2.5 倍, FasL 的阳性细胞率分别增加约 2.3、4.3 倍 ($P < 0.01$, 表 3)。

3.6 雷公藤甲素对肾脏中 bcl-2、bax、bid、bad、fas、fasL mRNA 表达的影响

实时 PCR 检测显示, ip 雷公藤甲素后, 大鼠肾脏中 bax、bid、bad、fas、fasL mRNA 的表达量明显升高, 且呈显著的剂量依赖性 ($P < 0.01$), 结果见表 4; 各组大鼠肾脏内 bcl-2 mRNA 的表达量无明显差别 ($P > 0.05$)。然而 bax/bcl-2 值却以剂量依赖方式明显升高 ($P < 0.01$): 在对照组, 该值仅为 1.02 ± 0.10 , 而雷公藤甲素 1、2 mg/kg 组中该值分别高达 2.70 ± 0.85 、 3.80 ± 0.82 。

4 讨论

在生理状态下,细胞凋亡对促进机体发育、维持机体内环境稳定起着十分重要的作用。然而病理性细胞凋亡或过度细胞凋亡却对机体造成严重损害。尽管已有研究证实许多肾脏疾病中都可见到大量肾小管上皮细胞凋亡,但细胞凋亡在雷公藤甲素急性肾毒性中的意义还不明确。在本研究中,通过 TUNEL 染色检查发现,与对照组大鼠相比,ip 雷公藤甲素后,大鼠肾脏内可见大量肾小管上皮细胞凋亡,且 AI 随剂量增大而升高,并与肾功能变化密切相关。因此,肾小管上皮细胞凋亡是雷公藤甲素所致大鼠急性肾损伤时重要的组织学基础之一。

Bcl-2 蛋白是 Bcl-2 家族中最重要的抗凋亡蛋白,它通过结合促凋亡蛋白 Bax,抑制其活性并阻止线粒体膜透化作用的发生以及细胞色素 C 的释放。在本研究中,尽管各组 Bcl-2 蛋白及其调控基因的表达量并无明显差异,但 ip 雷公藤甲素后,Bax 与 Bcl-2 蛋白表达量的比值却明显上升,提示 ip 雷公藤甲素后,肾小管上皮细胞内会有更多游离的 Bax 蛋白存在,这将有利于其发挥促凋亡活性,以触发细胞凋亡的发生。因此,Bax 与 Bcl-2 的比值决定着细胞的命运。

Bax 是 Bcl-2 家族中最重要的促凋亡“效应分子”,其能直接诱发线粒体外膜的透化作用以及细胞色素 C 的释放,但此前 Bax 必须先被激活才能发挥其促凋亡活性。研究表明,Bid 就是 Bax 重要的激活剂,因此被称为直接激活剂,而 Bid 激活 Bax 的这一过程常常被称为效应分子的“hit and run”活化过程^[16-17]。如前所述,ip 雷公藤甲素后,肾小管上皮细胞内有更多游离的 Bax 蛋白存在,这就需要更多 Bid 分子的参与以确保 Bax 的活化。在该实验中发现,与对照组相比,ip 雷公藤甲素后,大鼠肾脏中 Bid 蛋白及其调控基因的表达量明显增加,这就意味着 Bid 的表达量能够满足 Bax 分子激活所需,从而保证细胞凋亡的发生。

与 Bax 相似,Bid 的活性也会受到抗凋亡蛋白的抑制。Bcl-2 家族中的另一部分成员,如 Bad 蛋白等,尽管其不能像 Bid 那样直接激活 Bax,但其与抗凋亡蛋白之间存在很强的亲和力,因此其能竞争性地与抗凋亡蛋白结合,从而从抗凋亡蛋白中替换出被其结合的 Bid 分子,使得 Bid 发挥其生物学效应,以确保凋亡的发生^[18-20]。本研究发现,与对照组相比,ip 雷公藤甲素后,肾组织中 Bad 表达量

明显增加,提示有足够的 Bad 能够替换出足够的 Bid,以确保 Bax 的活化以及凋亡的发生。综上所述,Bcl-2 家族在雷公藤甲素诱导的肾小管上皮细胞凋亡的过程中起重要作用。

Fas 蛋白是存在于细胞表面、相对分子质量为 45 000 的一种膜受体蛋白(I 型膜蛋白),FasL 是相对分子质量约为 40 000 的 II 型膜蛋白,两者均属于肿瘤坏死因子(TNF)受体家族成员。Fas/FasL 被认为是与细胞凋亡密切相关的基因,Fas(CD95)与 Fas 配体结合可以诱导 Fas 阳性细胞凋亡^[21-23]。研究表明,在顺铂毒性、梗阻性肾病和移植肾急性排斥反应中,均可见 Fas/FasL 表达上调介导的肾小管上皮细胞凋亡。肾小管 Fas 与 FasL 表达均增强,相邻细胞相互作用诱发凋亡,即所谓“兄弟相杀(fratricide)效应”,在发病机制中有重要的意义。在本研究中发现,ip 雷公藤甲素后,大鼠肾组织中 Fas 与 FasL 的表达量明显增加,因此表明雷公藤甲素通过激活 Fas/FasL 介导的细胞凋亡途径诱发了肾小管上皮细胞的凋亡。

总之,单次大剂量 ip 雷公藤甲素会在短时间(48 h)内造成严重的肾损害,肾小管上皮细胞凋亡是雷公藤甲素所致大鼠急性肾损伤的重要组织学基础之一,而 Bcl-2 家族与 Fas/FasL 在雷公藤甲素诱导的肾小管上皮细胞凋亡中发挥了重要作用。对雷公藤毒性机制的研究将有助于预防与治疗雷公藤对人体各器官所产生的损伤,从而增加其用药安全性;有助于更科学、合理地使用这种疗效显著的传统中草药。

参考文献

- [1] Carter B Z, Mak D H, Schober W D, et al. Triptolide induces caspase-dependent cell death mediated via the mitochondrial pathway in leukemic cells [J]. *Blood*, 2006, 108(2): 630-637.
- [2] 刘媛,陈燕,赵菲,等. 雷公藤内酯醇对多发性骨髓瘤 RPMI 8226 细胞周期及 P21wip1/cip1 和 P27kip1 表达的影响 [J]. *中草药*, 2010, 41(11): 1819-1823.
- [3] Zhen Q S, Ye X Z, Wei J. Recent progress in research on tripterygium: a male antifertility plant [J]. *Contraception*, 1995, 51(2): 121-129.
- [4] Tengchaisri T, Chawengkirtikul R, Rachaphaew N, et al. Antitumor activity of triptolide against cholangiocarcinoma growth *in vitro* and in hamsters [J]. *Cancer Lett*, 1998, 133(2): 169-175.

- [5] Lu H, Hachida M, Enosawa S, *et al.* Immunosuppressive effect of triptolide *in vitro* [J]. *Transplant Proc*, 1999, 31(5): 2056-2057.
- [6] 吴少辉, 刘光明. 雷公藤内酯的提取、分析和药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(1): 36-39.
- [7] Gu W Z, Chen R, Brandwein S, *et al.* Isolation, purification, and characterization of immunosuppressive compounds from tripterygium: Triptolide and triptolidide [J]. *Int J Immunopharmacol*, 1995, 17(5): 351-356.
- [8] Tao X L, Cush J J, Garret M, *et al.* A phase I study of ethyl acetate extract of the Chinese antirheumatic herb *Tripterygium wilfordii* Hook F in rheumatoid arthritis [J]. *J Rheumatol*, 2001, 28(10): 2160-2167.
- [9] Shamon L A, Pezzuto J M, Graves J M, *et al.* Evaluation of the mutagenic, cytotoxic, and antitumor potential of triptolide, a highly oxygenated diterpene isolated from *Tripterygium wilfordii* [J]. *Cancer Lett*, 1997, 112(1): 113-117.
- [10] 薛 璟, 贾晓斌, 谭晓斌, 等. 雷公藤的肝毒性研究及 ADME/Tox 评价思路 [J]. 中草药, 2009, 40(4): 655-658.
- [11] 邓文龙. 雷公藤中毒及毒副反应报告研究 [J]. 中药药理与临床, 2001, 17(3): 42-47.
- [12] 刘 良, 王战勇, 黄光照, 等. 雷公藤甲素亚慢性中毒对昆明种小鼠肾脏及睾丸的影响 [J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2001, 30(3): 214-217.
- [13] 徐 旭, 汤立达. FDA 和 EMEA 批准 7 种肾损伤生物标志物正式使用 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(5): 347-350.
- [14] 孟凡翠, 徐为人, 张宗鹏, 等. 药物重要脏器毒性及其早期预测方法的探讨 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(1): 8-14.
- [15] Melnikov V Y, Faubel S, Siegmund B, *et al.* Neutrophil-independent mechanisms of caspase-1- and IL-18- mediated ischemic acute tubular necrosis in mice [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(8): 1083-1091.
- [16] Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk J E, *et al.* BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly [J]. *Mol Cell*, 2005, 17(4): 525-535.
- [17] Letai A, Bassik M C, Walensky L D, *et al.* Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics [J]. *Cancer Cell*, 2002, 2(3): 183-192.
- [18] Chen L, Willis S N, Wei A, *et al.* Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function [J]. *Mol Cell*, 2005, 17(3): 393-403.
- [19] Willis S N, Chen L, Dewson G, *et al.* Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins [J]. *Genes Dev*, 2005, 19(11): 1294-1305.
- [20] Willis S N, Fletcher J I, Kaufmann T, *et al.* Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak [J]. *Science*, 2007, 315(5813): 856-859.
- [21] Saxton N E, Barclay J L, Clouston A D, *et al.* Cyclosporin A pretreatment in a rat model of warm ischaemia/reperfusion injury [J]. *J Hepatol*, 2002, 36(2): 241-247.
- [22] Yoneyama K, Goto T, Miura K, *et al.* The expression of Fas and Fas ligand, and the effects of interferon in chronic liver diseases with hepatitis C virus [J]. *Hepatol Res*, 2002, 24(4): 327-337.
- [23] Mor G, Straszewski S, Kamsteeg M. Role of the Fas/Fas ligand system in female reproductive organs: Survival and apoptosis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64(9): 1305-1315.