

## 灵雷菌质对大鼠的肝脏毒性及对 Nrf2 蛋白表达的影响

梁永红<sup>1</sup>, 何礼标<sup>1</sup>, 苏明声<sup>1</sup>, 施 旻<sup>2</sup>, 谢小梅<sup>1\*</sup>, 杨 明<sup>1\*</sup>

1. 江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

2. 江西中医学院基础医学院 病理学教研室, 江西 南昌 330004

**摘要:** 目的 研究雷公藤固体发酵产物灵雷菌质的肝脏毒性。方法 SD 大鼠随机分为对照组、灵雷菌质组、雷公藤组, 灵雷菌质组及雷公藤组分别 ig 给予灵雷菌质、雷公藤 95%乙醇提取物 2.037 5、0.64 g/kg, 每日给药 1 次, 连续给药 30 d。给药结束后检测大鼠血液生化指标, 观察大鼠肝组织病理学改变, Western blotting 检测大鼠肝组织中 Nrf2、P38 蛋白表达。结果 肝组织病理学观察可见, 灵雷菌质组大鼠肝组织仅见中央细胞坏死, 周边细胞局部胞质溶解, 出现细胞凋亡; 雷公藤组肝组织可见小片状坏死, 核凋亡, 肝细胞内胶原纤维明显, 细胞溶解坏死。与对照组相比, 灵雷菌质组、雷公藤组大鼠丙氨酸转氨酶 (ALT) 水平、核蛋白 Nrf2 和总蛋白 P38 表达升高, 但灵雷菌质组的上述指标比雷公藤组显著下降 ( $P < 0.05$ )。与对照组相比, 灵雷菌质组、雷公藤组大鼠白蛋白 (ALB)、总蛋白 (TP) 均下降 ( $P < 0.05$ ), 而灵雷菌质组 ALB、TP 下降幅度较雷公藤组小 ( $P < 0.05$ )。结论 灵雷菌质的肝脏毒性较雷公藤低, 其毒性机制可能与激活 P38 MARK 和 Nrf2-ARE 信号通路、启动抗氧化作用有关。

**关键词:** 灵雷菌质; 雷公藤; 肝脏毒性; Nrf2; P38

中图分类号: R285.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)06-0731-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.06.019

## Hepatotoxicity of *Tripterygium wilfordii* after ganoderma solid fermentation and its effect on expression of Nrf2 in rats

LIANG Yong-hong<sup>1</sup>, HE Li-biao<sup>1</sup>, SU Ming-sheng<sup>1</sup>, SHI Min<sup>2</sup>, XIE Xiao-mei<sup>1</sup>, YANG Ming<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

**Abstract: Objective** To investigate the hepatotoxicity of *Tripterygium wilfordii* after ganoderma solid fermentation product—Ling-Lei fermentation substance. **Methods** SD rats were randomly separated into three groups: control (C), Ling-lei fermentation substance (LF), and *T. wilfordii* (TW) groups. SD rats in LF and TW groups were ig administered with 95% ethanol extract of Ling-lei fermentation substance and *T. wilfordii* at the doses of 2.037 5 and 0.64 g/kg, respectively once a day for consecutive 30 d. After administration, the blood biochemical index and liver histopathological examination were determined. The expression levels of Nrf2 and P38 protein in liver tissue were tested by Western blotting. **Results** The liver histopathological examination revealed that rats in LF group showed the central cells necrosis in liver tissue only, the local cytoplasm dissolved in peripheral cells, and the apoptosis appeared. Rats in TW group showed the small necrosis, nuclear apoptosis, obvious collagen fibers in liver cells, and cells dissolved the necrosis. Compared with C group, content of alanine aminotransferase (ALT), expression levels of nucleoprotein Nrf2 and P38 protein of rats in LF and TW groups increased, while these indicators in LF group decreased obviously compared with TW group ( $P < 0.05$ ). The levels of albumin (ALB) and total protein (TP) in LF and TW groups decreased compared with C group ( $P < 0.05$ ), while ALB and TP in LF group decreased significantly compared with TW group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The hepatotoxicity of Ling-lei fermentation substance is lower than that of *T. Wilfordii*, and its toxic mechanism may be associated with anti-oxidation initiated by activating the P38 MARK and the Nrf2-ARE signaling pathways.

**Key words:** *Tripterygium wilfordii* after ganoderma solid fermentation; *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; hepatotoxicity; Nrf2; P38

收稿日期: 2012-06-08

基金项目: 国家“973”资助项目 (2009CB522801)

作者简介: 梁永红、何礼标并列第一作者。

\*通信作者 谢小梅 Tel: (0791)87118707 E-mail: jxxm1964@sina.com

杨 明 Tel: (0791)87119118 E-mail: yangming16@126.com

雷公藤具有抗炎、免疫抑制作用,在临床广泛用于治疗类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等,对神经免疫性疾病,如阿尔茨海默病、帕金森病等也有疗效<sup>[1-3]</sup>。但由于雷公藤毒性很强,因而限制了其临床应用。雷公藤可引起肝脏毒性且毒理机制复杂,比较公认的毒理机制主要包括脂质过氧化引起的氧化应激损伤<sup>[4]</sup>。肝脏的 Nrf2-Keap1-ARE 相互作用调节编码抗氧化蛋白,是细胞抗氧化反应的中枢调节者<sup>[5]</sup>,此信号通路在抗药物氧化应激损伤的作用已有报道<sup>[6]</sup>。本实验室在雷公藤双向固体发酵减毒的研究中发现,雷公藤经特定药用真菌固体发酵后能明显降低雷公藤的毒性且保持其原有的药效<sup>[7]</sup>。本实验比较雷公藤固体发酵后产物灵雷菌质和雷公藤对大鼠肝脏毒性,并探讨其毒性机制,为灵雷菌质的深入开发和应用提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

带皮雷公藤,购自福建省汉堂生物制药股份有限公司,经江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室刘荣华教授鉴定为卫矛科雷公藤属植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 的根。灵雷菌质为本实验室以带皮雷公藤发酵获得<sup>[8]</sup>。兔抗 Nrf2 单克隆抗体,北京博奥森生物技术有限公司;兔抗 P38 单克隆抗体、辣根酶标记山羊抗兔 IgG,北京中杉金桥生物技术有限公司;色谱级甲醇, Tedia 公司; Milli Q 纯化系统制备超纯水;其他试剂均为分析纯。

### 1.2 动物

清洁级 SD 大鼠,7~8 周龄,体质量(150±20)g,雌雄各半,购自江西中医学院实验动物中心,许可证号:SCXK(赣)2005-0001。

### 1.3 仪器

DU730 核酸/蛋白分析仪,美国 Beckman 公司;半干转膜仪,Amersham Biosciences 公司;凝胶成像分析仪,美国 Labwork 公司;低温高速离心机,美国 Sigma 公司;CM120 透射电镜,荷兰 Philips 公司;双筒电光源显微镜,日本 Olympus 公司;超纯水系统,美国 Millipore 公司;日立 7180 全自动生化分析仪。

## 2 方法

### 2.1 提取物制备

分别取灵雷菌质和雷公藤各 3 kg,用 8 倍体积的 95%乙醇提取 2 次,每次 2 h,合并 2 次提取液,浓缩,60℃烘干,碾碎成粉末,用双蒸水配制成所需浓度的混悬液。经 HPLC 法测定,雷公藤、灵雷

菌质乙醇提取物分别含雷公藤甲素 115.80、6.8 μg/g。

### 2.2 分组与给药

大鼠随机分为对照组、灵雷菌质组、雷公藤组,每组 10 只。灵雷菌质组及雷公藤组分别给予相应提取物 2.037 5<sup>[9]</sup>、0.64 g/kg<sup>[10]</sup>(分别为两种药物长期毒性实验的高剂量),给药体积 10 mL/kg,每天 ig 给药 1 次,连续给药 30 d,对照组给予等量蒸馏水,实验期间大鼠自由进食、饮水。30 d 后大鼠腹主动脉取血,分离血清,处死大鼠,取肝脏组织。

### 2.3 血清生化指标检测

全自动生化分析仪检测大鼠血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)水平。

### 2.4 肝脏组织病理学观察

取部分肝组织,10%中性福尔马林固定,常规酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,2~3 μm 切片,常规 HE 染色,中性树胶封片,光学显微镜(×100)观察。另取已在 2.5%戊二醛固定 12 h 以上的肝脏组织,梯度酒精、丙酮脱水,环氧树脂包埋,分别醋酸铅和枸橼酸铅染色,超薄切片(50~70 nm),电镜下观察。

### 2.5 Western blotting 法检测 Nrf2、P38 蛋白表达

取部分肝脏组织,加入含 10 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF)400 μL 的单去污裂解液冰浴上裂解 30 min,4℃、12 000 r/min 离心 5 min,取上清即为组织总蛋白。取小块肝脏组织,按常规方法加入裂解 A 液和 B 液,冰上裂解 15 min,4℃、12 000 r/min 离心 10 min,取上清即为组织核蛋白。考马斯亮蓝法进行蛋白定量,总蛋白上样 70 μg 检测 P38,核蛋白上样 80 μg 检测 Nrf2,兔抗 Nrf2 抗体(1:400)、兔抗 P38 抗体(1:300)4℃孵育过夜,洗辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体(1:4 000)37℃孵育 45 min,ECL 试剂发光,LabWorks 4.5 软件(美国 UVP 公司)对条带进行统计分析。

### 2.6 统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计软件,所得计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验。

## 3 结果

### 3.1 对大鼠血清生化指标的影响

与对照组比较,灵雷菌质组、雷公藤组大鼠血清中 ALT 水平明显升高,ALB 和 TP 水平明显降低( $P<0.05$ 、 $0.01$ );与雷公藤组比较,灵雷菌质组大鼠血清中 ALT 水平明显降低,ALB 和 TP 水平明显升高( $P<0.05$ );提示灵雷菌质和雷公藤对大鼠肝脏均有毒性,但灵雷菌质毒性较雷公藤弱,结果见表 1。

表 1 灵雷菌质和雷公藤提取物对大鼠血清中 ALT、ALB 和 TP 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effect of *T. wilfordii* after ganoderma solid fermentation and *T. wilfordii* on ALT, ALB, and TP in serum of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组 别  | 剂量 / ( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) | ALT / ( $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | ALB / ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | TP / ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) |
|------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 对照   | —                                        | 27.800 ± 8.167                           | 36.200 ± 1.817                           | 63.660 ± 2.060                          |
| 灵雷菌质 | 2.037 5                                  | 41.429 ± 8.364 <sup>*△</sup>             | 31.571 ± 1.694 <sup>**△</sup>            | 57.500 ± 0.337 <sup>**△</sup>           |
| 雷公藤  | 0.64                                     | 53.250 ± 4.573 <sup>**</sup>             | 30.833 ± 4.661 <sup>*</sup>              | 55.143 ± 3.294 <sup>**</sup>            |

与对照组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ; 与雷公藤组比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$ , 下表同

<sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  vs *T. wilfordii* group, same as below

### 3.2 各组大鼠肝组织病理学观察

**3.2.1 光镜观察** 对照组大鼠肝脏组织未见明显的病理学变化; 灵雷菌质组大鼠肝脏组织可见肝细胞轻度萎缩, 少数肝细胞呈嗜酸病变、凋亡、增生, 骨髓造血细胞增生; 雷公藤组大鼠肝脏组织呈现肝细胞嗜酸性变, 肝条索萎缩, 血窦充血, 部分肝小叶周围间质纤维组织增多, 淋巴细胞浸润, 多处小片状坏死。结果见图 1。

**3.2.2 电镜观察** 对照组大鼠肝组织除细胞间隙稍微增宽外, 未见明显的病理改变。灵雷菌质组大鼠肝组织可见大量球形线粒体, 中央细胞坏死, 周边细胞局部胞质溶解, 凋亡小体残存细胞器, 核内空泡, 细胞凋亡, 核周隙增宽。雷公藤组大鼠肝组织可见核凋亡, 核周自噬泡多见, 内含层状结构, 肝细胞内侧面见胶原纤维明显, 线粒体肿胀, 见较多脂滴, 细胞溶解坏死, 细胞器变性退变。结果见图 2。

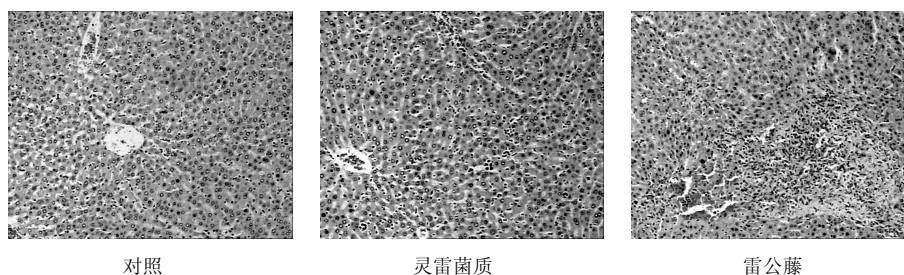


图 1 各组大鼠肝组织病理学光镜观察

Fig. 1 Pathological observation of liver tissue of rats in each group by light microscopy

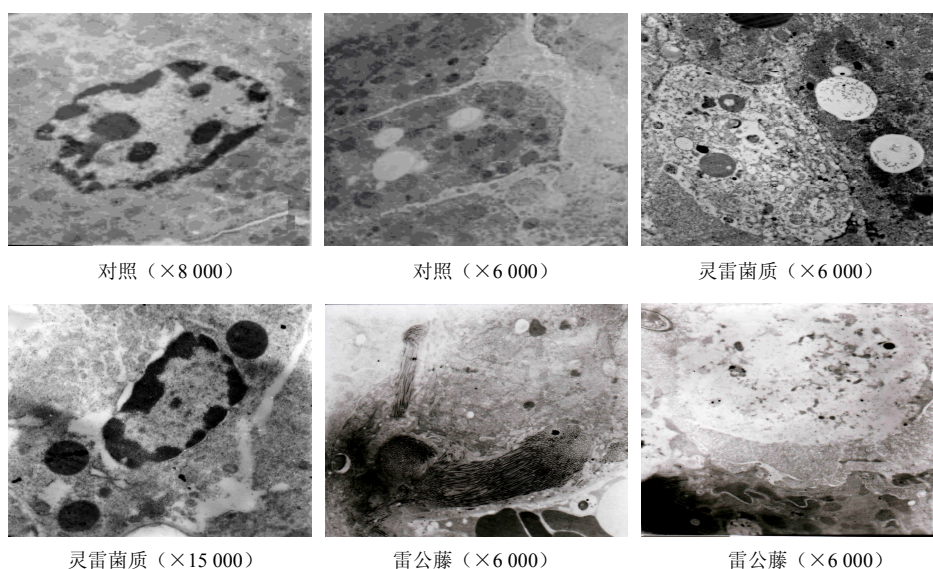


图 2 各组大鼠肝组织超微结构电镜观察

Fig. 2 Ultrastructure observation on liver tissues of rats in each group by electron microscopy

### 3.3 对大鼠肝组织 Nrf2 及 P38 蛋白表达的影响

与对照组比较, 灵雷菌质组、雷公藤组核蛋白 Nrf2、总蛋白 P38 表达明显升高 ( $P<0.05$ ); 与雷公藤组比较, 灵雷菌质组核蛋白 Nrf2、总蛋白 P38 表达显著降低 ( $P<0.05$ )。结果见表 2、图 3。

表 2 灵雷菌质和雷公藤提取物对大鼠肝组织 Nrf2 和 P38 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 2 Effect of *T. wilfordii* after ganoderma solid fermentation on protein expression of Nrf2 and P38 in liver tissue of rats ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别   | 剂量 / (g·kg <sup>-1</sup> ) | Nrf2                        | P38                           |
|------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 对照   | —                          | 0.610 0±0.072               | 0.675 3±0.127 0               |
| 灵雷菌质 | 2.037 5                    | 0.839 0±0.034 <sup>*△</sup> | 1.001 7±0.087 9 <sup>*△</sup> |
| 雷公藤  | 0.64                       | 1.316 7±0.116 <sup>*</sup>  | 1.217 3±0.022 8 <sup>*</sup>  |



图 3 灵雷菌质和雷公藤提取物对大鼠肝组织 Nrf2 和 P38 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of *T. wilfordii* after ganoderma solid fermentation on protein expression of Nrf2 and P38 in liver tissue of rats

## 4 讨论

本课题组应用双向固体发酵技术, 以雷公藤为固体发酵的药性基质, 灵芝为发酵菌种, 共同构成发酵组合, 在特定条件下进行发酵, 真菌的酶催化雷公藤中的化学成分发生反应, 在某一时间点产生具有最佳功效的发酵药材称为灵雷菌质<sup>[11]</sup>。本实验给予大鼠灵雷菌质和雷公藤 95%乙醇提取物, 血清生化指标检测结果显示和肝组织病理学观察均显示灵雷菌质的肝毒性较雷公藤弱。

在雷公藤引起的肝毒性机制中, 脂质过氧化反应是重要的发病机制之一<sup>[3]</sup>。核转录相关因子 Nrf2 是一个氧化还原敏感性转录因子编码的解毒系统, 可以启动多种抗氧化酶及 II 相酶活化, 在细胞抵御氧化应激反应的机制中发挥至关重要的作用<sup>[12]</sup>。在

生理情况下, Nrf2 与胞浆蛋白分子 Keap1 结合使活性处于相对抑制状态, 通过泛素化途径降解; 当电刺激或氧化应激攻击后, Keap1 构型发生改变, Nrf2 与 Keap1 解偶联后转移入核与抗氧化反应元件 (ARE) 结合, 相互作用调节编码抗氧化蛋白和 II 相解毒酶的表达<sup>[5]</sup>。由此可知, Nrf2 是外源性有毒物质和氧化应激的感受器。HO-1 属于热休克蛋白家族, 具有明显的抗炎、抗氧化作用, 是血红素代谢的限速酶。Nrf2-ARE 通路中受到多种丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路的影响, 包括细胞外信号调节激酶 (ERKs)、Jun 氨基末端激酶 (JNKs)、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MARK) 等<sup>[13]</sup>。Nrf2-ARE 信号通路的激活受 P38 的调节, 雷公藤红素可上调 Nrf2-ARE 通路的 Nrf2, 激活 HO-1, 从而达到抗氧化应激的作用<sup>[14-15]</sup>。本实验结果表明, 灵雷菌质组、雷公藤组的 Nrf2、P38 的表达虽均显著高于对照组, 但与雷公藤组比较, 灵雷菌质组 Nrf2、P38 的表达显著降低。由此推测当大鼠服用一定量的雷公藤后, 肝组织中的活性氧升高, 使 Nrf2、P38 蛋白表达上调, 不能充分诱导 HO-1 等 II 相解毒酶的合成, 从而造成肝毒性; 而灵雷菌质能很好地调节 Nrf2 蛋白和 P38 蛋白的表达。

综上所述, 灵雷菌质的肝毒性较雷公藤低, 其毒性机制可能与激活 P38 MARK 和 Nrf2-ARE 信号通路、启动抗氧化作用有关, 至于其是否通过启动 HO-1 的表达而产生毒性, 还有待进一步的研究。

## 参考文献

- [1] 刘为萍, 刘素香, 唐慧珠, 等. 雷公藤研究新进展 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1215-1218.
- [2] 潘晓东, 陈晓春. 雷公藤提取物在神经免疫性疾病中的药理效应和机制研究进展 [J]. 药学报, 2008, 4(12): 1179-1185.
- [3] Gao J P, Sun S, Li W W, et al. Triptolide protects against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced dopaminergic neurotoxicity in rats: implication for immunosuppressive therapy in Parkinson's disease [J]. *Neurosci Bull*, 2008, 24(3): 133-142.
- [4] 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.
- [5] 李 航, 任温卓, 刘淑霞, 等. 叔丁基对苯二酚对糖尿病小鼠肾脏氧化应激损伤及 Nrf2 蛋白表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25(10): 1341-1345.
- [6] Tanaka Y, Aleksunes L M, Cui Y J, et al. ANIT-induced

- intrahepatic cholestasis alters hepatobiliary transporter expression via Nrf2-dependent and independent signaling [J]. *Toxicol Sci*, 2009, 108(2): 247-257.
- [7] 庄毅, 谢小梅. 药用真菌新型 (双向性) 固体发酵工程对雷公藤解毒持效的初步研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(16): 2083-2087.
- [8] 苏明声, 谢小梅, 罗闯丹, 等. 雷公藤解毒持效双向发酵工艺的建立 [J]. 菌物学报, 2010, 29(2): 294-299.
- [9] 周雪娥, 谢卫华, 罗闯丹, 等. 灵雷菌质对阿霉素诱导大鼠肾病模型的作用 [J]. 中草药, 2010, 41(05): 771-774.
- [10] 赵永健, 谢小梅. 雷公藤毒作用的初步实验研究 [D]. 南昌: 江西中医学院, 2011.
- [11] 王君明, 崔瑛, 申玲玲, 等. 中药致药源性肝损伤的氧化应激机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 247-249.
- [12] Nishimura J, Dewa Y, Okamura T, *et al.* Role of Nrf2 and oxidative stress on fenofibrate-induced hepatocarcinogenesis in rats [J]. *Toxicol Sci*, 2008, 106(2): 339-349.
- [13] Roux P P, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: A family of protein kinases with diverse biological functions [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 68(2): 320-344.
- [14] Jeong G S, Lee D S, Li B, *et al.* Protective effect of sauchinone by upregulating hemeoxygenase-1 via the P38 MAPK and Nrf2/ARE pathways in HepG2 Cells [J]. *Planta Med*, 2010, 76(1): 41-46.
- [15] Won Y S, Ah R G, Sung M J, *et al.* Celastrol induces expression of hemeoxygenase-1 through ROS/Nrf2/ARE signaling in the HaCaT cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407(3): 535-540.