

• 药理与临床 •

雷公藤红素对胆管细胞的毒性作用及机制研究

李雅静, 李 森, 吴建芝, 李晓骄阳*

北京中医药大学生命科学院, 北京 100029

摘要: **目的** 研究雷公藤红素对人肝内胆管上皮细胞(human biliary epithelial cells, HIBEC)的毒性作用及机制。**方法** 通过 CCK-8 实验及显微镜观察记录雷公藤红素对细胞形态和活力的影响; 通过细胞划痕实验检测雷公藤红素对细胞迁移能力的影响; 通过流式细胞术检测雷公藤红素对细胞周期的影响和对细胞凋亡的诱导作用; 通过 qRT-PCR 和 Western blotting 检测雷公藤红素对凋亡相关基因 Caspase-3、Bax、Bcl-2 基因和蛋白的表达情况。**结果** 雷公藤红素在 400~2 000 nmol/L 下, 抑制细胞增殖, 改变细胞形态; 在 200~800 nmol/L 下, 抑制细胞的迁移能力; 在 800~1 200 nmol/L 下, 出现 G₀/G₁ 期阻滞作用; 在 400~1 200 nmol/L 下, 诱导细胞凋亡并增加相关基因的表达量。**结论** 雷公藤红素可通过影响胆管细胞活力, 改变其迁移能力, 阻滞细胞周期并促进细胞凋亡的方式产生胆管毒性。

关键词: 雷公藤红素; 人肝内胆管上皮细胞; 细胞凋亡; 胆管毒性; 细胞增殖

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)14-3700-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.14.013

Toxicity and mechanisms of celastrol on human biliary epithelial cells

LI Ya-jing, LI Sen, WU Jian-zhi, LI Xiao-jiaoyang

School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: **Objective** To investigate the toxicity and mechanisms of celastrol (CEL) on human biliary epithelial cells. **Methods** The effects of CEL on cell morphology and cell viability changes were observed by CCK-8 experiment and microscope. Cell scratch experiment was used to detect the effect of CEL on cell migration. The effects of CEL on cell cycle and cell apoptosis were detected by flow cytometry. The mRNA and protein expression of apoptosis-related genes Caspase-3, Bax and Bcl-2 were detected by qRT-PCR and Western blotting. **Results** CEL inhibited cell proliferation and changed cell morphology at 400—2 000 nmol/L. At 200—800 nmol/L, cell migration was inhibited. At 800—1 200 nmol/L, G₀/G₁ phase was arrested. At 400—1 200 nmol/L, cell apoptosis was induced and the expression of apoptosis-related genes was increased. **Conclusion** CEL showed cholangiocyte toxicity through affecting cell viability, cell migration, preventing cell cycle and promoting cell apoptosis of human biliary epithelial cells.

Key words: celastrol; human biliary epithelial cells; apoptosis; cholangiocyte toxicity; proliferation

雷公藤红素(celastrol)是从卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 的根皮中提取出的一种三萜类天然产物, 是雷公藤的主要活性成分之一^[1], 具有抗肿瘤、抗炎、改善肝纤维化等药理作用^[2-3]。抗肿瘤作用方面, 雷公藤红素可抑制肝癌细胞中热休克蛋白(Hsp90)表达量, 抑制 Hsp90 对肿瘤细胞生长蛋白的稳定作用, 抑制肝癌细胞增殖^[4]; 并可抑制肝癌蛋白激酶 B(AKT)通路和血管内皮生长因子(VEGF)自分泌系统协助索拉非尼

(Sorafenib)诱导肝癌细胞凋亡^[5]。抗炎作用方面, 雷公藤红素可降低肝细胞中白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等炎症因子的表达水平^[6]; 并可通过抑制炎症因子激活 AMPK-SIRT3 信号通路减轻肝纤维化^[7]。另外, 部分研究显示雷公藤红素可通过抑制基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和 MMP-9 靶点, 改善妊娠肝内胆淤积症^[8]。

近年来, 随着中药现代化研究的不断推进, 中药及其有效成分的肝毒性引起了广泛的关注, 由药

收稿日期: 2020-01-14

基金项目: 北京市科技新星课题(Z191100001119088); 北京市双一流课题(1000041510087)

作者简介: 李雅静, 硕士研究生, 研究方向为中药源性肝损伤。

*通信作者 李晓骄阳, 教授, 博士生导师。E-mail: xiaojiaoyang.li@bucm.edu.cn

物肝毒性引起的肝损伤称为药源性肝损伤^[9]。药源性肝损伤有多种表现形式和作用细胞,其中药源性胆管损伤可导致胆管结构破坏进而诱发胆汁淤积、肝胆共损伤、原发性硬化性胆道炎等多种肝胆疾病。胆管是肝肠循环功能的重要结构之一,并且胆管细胞参与胆汁的形成和调节^[4]。在肝移植排斥反应和免疫介导的原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆道炎中,胆管细胞最先受到损伤^[10]。

目前,针对雷公藤红素对肝脏正常肝实质和非实质细胞的损伤作用机制探索较少,且研究对象主要集中在肝细胞,雷公藤红素抑制大鼠原代肝细胞中的细胞色素 450 酶(CYP450s)活性升高活性氧(ROS),造成肝细胞损伤^[11]。但在肝细胞损伤之前可能存在胆管细胞损伤。然而,雷公藤红素对于胆管细胞的药理作用及作用机制却未见报道。鉴于以上原因,本研究以人肝内胆管上皮细胞(Human biliary epithelial cells, HIBEC)为研究对象,观察雷公藤红素对其增殖、迁移、细胞周期、细胞凋亡的影响,并检测相关基因 Caspase-3、Bax、Bcl-2 的变化情况,初步阐明雷公藤红素对胆管细胞的药理作用及其机制,为临床用药选择提供剂量范围参考和基础数据支撑。

1 材料

1.1 细胞

HIBEC 是人源胆管细胞,来源于中国科学院上海细胞生物学研究所,并由本实验室长期保存。

1.2 药物与试剂

雷公藤红素(中国食品药品检定研究院,批号 34157-83-0,质量分数 $\geq 98\%$); MEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);青霉素-链霉素(美国 Invitrogen 公司,批号 10378016);二甲基亚砜(美国 VWR Life Science 公司,批号 0247C211);磷酸盐缓冲液(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号 20180816); CCK-8 检测试剂盒(新赛美公司, C6005); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司,批号 RK242680); RNA 提取试剂盒(Vazyme, RNA Isolation Kit, RC101-01 50rxn); Western blotting Kit 高灵敏度化学发光检测试剂盒(北京兰博利德生物技术有限公司,批号 #0090C090); Annexin V-EGFP 细胞凋亡检测试剂盒(Beyotime 公司); Cell Cycle Assay Kit(北京拜尔迪生物技术有限公司,批号 #253012); β -actin(批号 #3180247)、Caspase-3(批号 #9662)、Bax(批号

#5023)、Bcl-2(批号 #3498)、CK-7(批号 #4465)抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.3 仪器

Cyto FLEX 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司); HERA cellvios 160i CO₂ 培养箱(美国 Thermo Scientific 公司); CKX53 倒置光学显微镜(日本 Olympus 公司); 1300SERIESA2 生物安全柜(美国 Thermo Scientific 公司); Spectramax i3x 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); 5424R 冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); Real-Time PCR System (Quant StudioTM 6 Flex)。

2 方法

2.1 CK-7 角蛋白表达验证

细胞点板前调整 HIBEC 细胞密度为 1.3×10^5 个/mL,将细胞接种于共聚焦小皿中过夜,待细胞贴壁后,弃去培养基,用 PBS 荡洗小皿后加入 4% 多聚甲醛,待细胞固定后用 PBS 荡洗小皿。加入 0.1% Triton-X-100 进行封闭,30 min 后用 PBS 荡洗小皿,加入 100 μ L 胆管细胞标志物抗体 CK-7(1:1 000 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。孵育完毕后,用 PBS 荡洗并室温避光孵育荧光二抗(1:2 500 稀释)^[12]。DAPI 室温避光染色 8 min 后,用激光共聚焦显微镜观察并记录细胞荧光情况。

2.2 细胞培养

HIBEC 细胞用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基培养,培养条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂。根据细胞生长状态,2~3 d 进行换液,当细胞密度达到 80%~85% 时,按 1:3 进行传代培养,传至第 5~7 代后用于实验。

2.3 CCK-8 法检测细胞增殖

2.3.1 细胞加药处理 细胞点板前将密度调整为 1.0×10^5 个/mL,取 100 μ L 接种于 96 孔细胞培养板中,培养 6 h 待细胞贴壁后,加入含药培养基 100 μ L,使得雷公藤红素终浓度为 100、200、400、800、1 200、2 000 nmol/L,每个浓度均设置 6 个复孔,同时设置正常培养的细胞为对照组,继续培养 24 h。

2.3.2 细胞形态学观察 按照“2.3.1”项方法接种及加药处理细胞,培养 24 h 后在倒置显微镜下观察并记录各组细胞形态。

2.3.3 细胞存活率测定 酶标仪测定吸光度(A)值,按照“2.3.1”项方法接种及加药处理细胞,培养 24 h 后每孔加入含有 10% CCK-8 溶液的培养基 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h,通过酶标仪测定 490 nm 处 A 值,计算细胞存活率。

细胞存活率 = $A_{\text{药物}} / A_{\text{对照}}$

2.4 划痕实验检测细胞迁移

细胞点板前将密度调整为 3.25×10^5 个/mL, 将 HIBEC 细胞接种于 6 孔板, 放入细胞培养箱过夜。待细胞贴壁且在底面形成单层紧密相连的细胞层后, 用移液器枪头水平划线, 给药, 雷公藤红素终浓度为 0、200、400、800 nmol/L, 分别于给药后 0、12、24 h 观察并记录细胞愈合情况。通过 Image J 软件统计不同时间点各组细胞的划痕面积, 以 0 h 的划痕面积为基准, 计算相对值并绘制柱状图。

2.5 流式细胞术检测细胞周期

细胞点板前将密度调整为 3.0×10^5 个/mL, 将 HIBEC 细胞接种于 6 孔板, 放入细胞培养箱过夜。细胞贴壁后换新鲜培养基, 给药, 雷公藤红素终浓度为 0、200、400、800、1 200 nmol/L, 继续培养 24 h。用 0.25% 胰酶消化为单细胞悬液, 4°C 离心后去上清。用 PBS 重悬, 4°C 、 $250 \times g$ 离心 5 min, 去上清。加入冰的 70% 乙醇固定细胞。固定结束后, 4°C 、 $600 \times g$ 离心 5 min, 去上清。加入 1 mL PBS, 振荡使细胞悬浮, 4°C 、 $250 \times g$ 离心 5 min, 去上清。加入 180 μL Staining Buffer 重悬细胞, 然后加入 10 μL RNaseA 和 10 μL PI, 轻轻混匀, 37°C 避光孵育 30 min。染色完成后, 再加入 200 μL Staining Buffer, 用流式细胞仪检测并分析^[13]。

2.6 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡

细胞点板前将密度调整为 3.0×10^5 个/mL, 将 HIBEC 细胞接种于 6 孔板, 放入细胞培养箱过夜。细胞贴壁后换新鲜培养基, 1 h 后, 给药, 雷公藤红素终浓度为 0、400、800、1 200 nmol/L, 继续培养 24 h。0.25% 胰酶消化细胞, 加入培养基终止消化, 并将细胞悬液全部转移至离心管中, $1\,000 \times g$ 离心 5 min, 去上清, 用 PBS 轻轻重悬, 4°C 、 $250 \times g$ 离心 5 min, 去上清。加入 195 μL Annexin V-EGFP 结合液轻轻重悬细胞。加入 5 μL Annexin V-EGFP, 轻轻混匀。加入 10 μL 碘化丙啶 (PI) 染色液, 轻轻混匀。室温避光孵育 10~20 min, 流式细胞仪检测并分析, Annexin V-EGFP 为绿色荧光, PI 为红色荧光。

2.7 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 反应

细胞点板前将密度调整为 3.0×10^5 个/mL, 将 HIBEC 细胞接种于 6 孔板, 放入细胞培养箱过夜。细胞贴壁后换新鲜培养基, 1 h 后, 给药, 雷公藤红素终浓度为 0、400、800、1 200 nmol/L, 继续培养

24 h。吸弃培养基, 按照 Vazyme RNA 提取试剂盒 (Vazyme, RNA Isolation Kit, RC101-01 50rxn) 溶于 RNase free 水, 获得 RNA 原液, 用紫外分光光度计检测 A 值^[14]。依据 Vazyme 逆转录和扩增试剂盒说明书, 将提取的 RNA 逆转录为 cDNA 后进行扩增, 扩增体系为 95°C 反应 10 min, 39 个循环的 95°C 反应 15 s 和 60°C 反应 30 s。设置 2 个复孔, 以 HPRT1 为内参进行 qRT-PCR 检测, 检测基因: Caspase-3、Bax、Bcl-2。

2.8 蛋白免疫印迹检测 (Western blotting)

细胞点板前将密度调整为 3.0×10^5 个/mL, 细胞贴壁后换新鲜培养基, 给药, 雷公藤红素终浓度为 0、400、800、1 200 nmol/L, 继续培养 24 h。弃去培养基, 每孔加入 100 μL 预冷的 RIPA 溶液收集样品, 采用 BCA 法测定蛋白质质量浓度。制备 10% SDS-PAGE 凝胶, 蛋白与 loading buffer 预混并加热变性, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 湿法转膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加入相应抗体 4°C 孵育过夜, TBST 漂洗 3 次后加入相应的二抗 (稀释 1:2 000), 室温孵育 1 h 后 TBST 漂洗 3 次, 于凝胶成像系统下成像, 并用 Quantity One 软件进行分析。

2.9 统计学处理

实验数据采用 GraphPad Prism 5 软件 (GraphPad, San Diego, CA) 进行分析。对数据进行单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

3 结果

3.1 胆管细胞 CK-7 角蛋白表达验证

激光共聚焦显微镜观察并记录的细胞荧光情况 (图 1) 显示, 本研究所用细胞的细胞膜上 CK-7 膜蛋白被抗体结合且被激光共聚焦显微镜记录, 呈现绿色荧光。

3.2 对 HIBEC 增殖的影响

倒置显微镜明场模式记录的细胞形态变化结果表明 (图 2), 雷公藤红素给药浓度在 100、200 nmol/L 时, 细胞形态变化不明显, 给药浓度加大至 400、

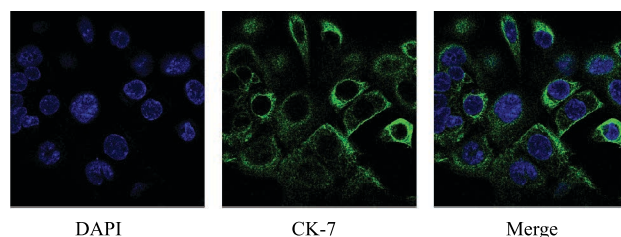


图 1 HIBEC 细胞 CK-7 角蛋白表达

Fig. 1 Expression of keratin CK-7 in HIBEC

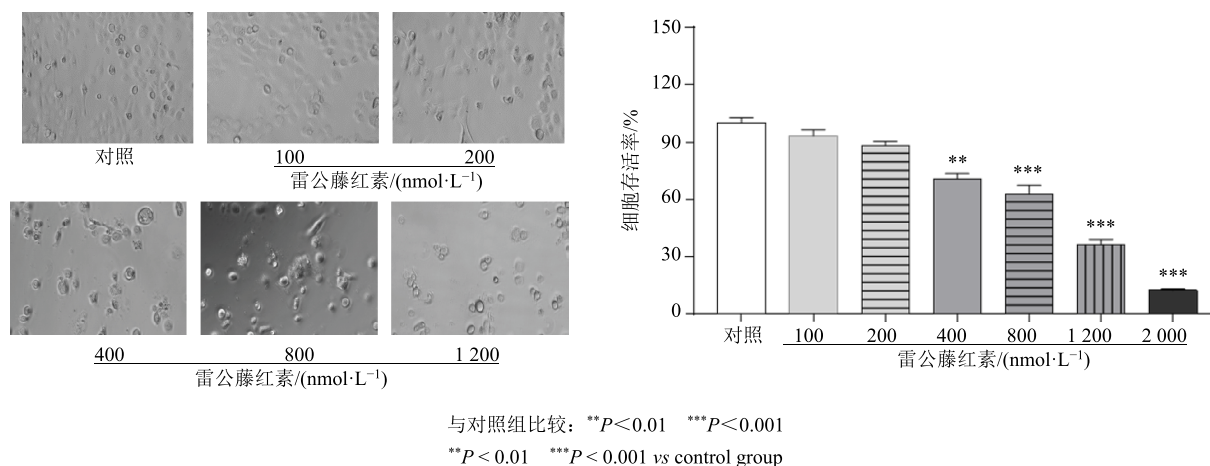


图 2 雷公藤红素对 HIBEC 细胞形态及存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effects of celastrol on cell morphology and viability of HIBEC ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

800、1 200 nmol/L 时细胞逐渐皱缩成圆形, 并且随着给药浓度的增加, 皱缩细胞的比例增加。CCK-8 检测结果显示, 与对照组相比, 给药处理 24 h 后, HIBEC 细胞存活率明显下降, 差异显著 ($P < 0.01$ 、0.001), 雷公藤红素可明显抑制 HIBEC 细胞增殖 (图 2)。

3.3 对 HIBEC 迁移的影响

划痕实验结果见图 3, 12、24 h 药物处理后相对划痕面积越大, 表明细胞愈合能力越低。结果显示, 雷公藤红素各浓度 (200、400、800 nmol/L) 处理 HIBEC 细胞 12、24 h 后, 细胞迁移能力被明显抑制, 与对照组比较, 差异显著 ($P < 0.01$ 、0.001)。且随着雷公藤红素浓度升高, 胆管细胞的划痕愈合能力越低, 提示雷公藤红素具有抑制 HIBEC 细胞迁移能力的作用。

3.4 对 HIBEC 细胞周期的阻滞作用

流式细胞术检测细胞周期结果 (图 4) 表明, 与对照组比较, HIBEC 细胞经 800、1 200 nmol/L 雷公藤红素处理后, G_0/G_1 期的细胞比例明显增多 ($P < 0.01$), 提示雷公藤红素可能通过将 HIBEC 细胞阻滞在 G_0/G_1 期, 从而抑制其增殖。

3.5 对 HIBEC 细胞凋亡的诱导作用

Annexin V/PI 双染法结果 (图 5) 显示, 对照组早期凋亡细胞占比为 6.35%, 晚期凋亡细胞占比为 23.79%。800、1 200 nmol/L 雷公藤红素处理后晚期凋亡的细胞比例显著增加 ($P < 0.01$ 、0.001), 且 1 200 nmol/L 浓度下, 处于晚期凋亡的细胞比例大于 800 nmol/L 浓度下晚期凋亡的细胞比例, 提示雷公藤红素可浓度依赖性的诱导 HIBEC 细胞凋亡。

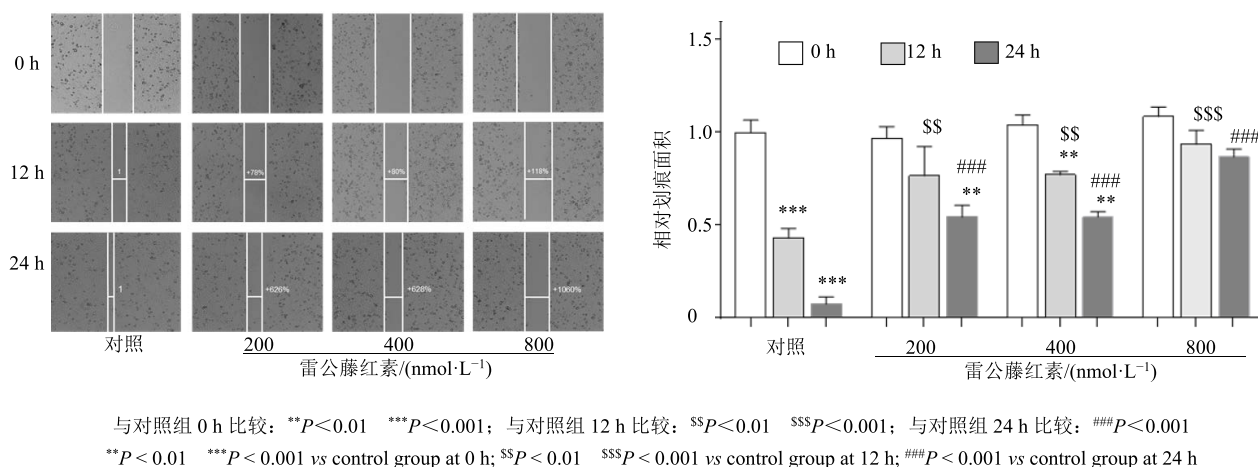
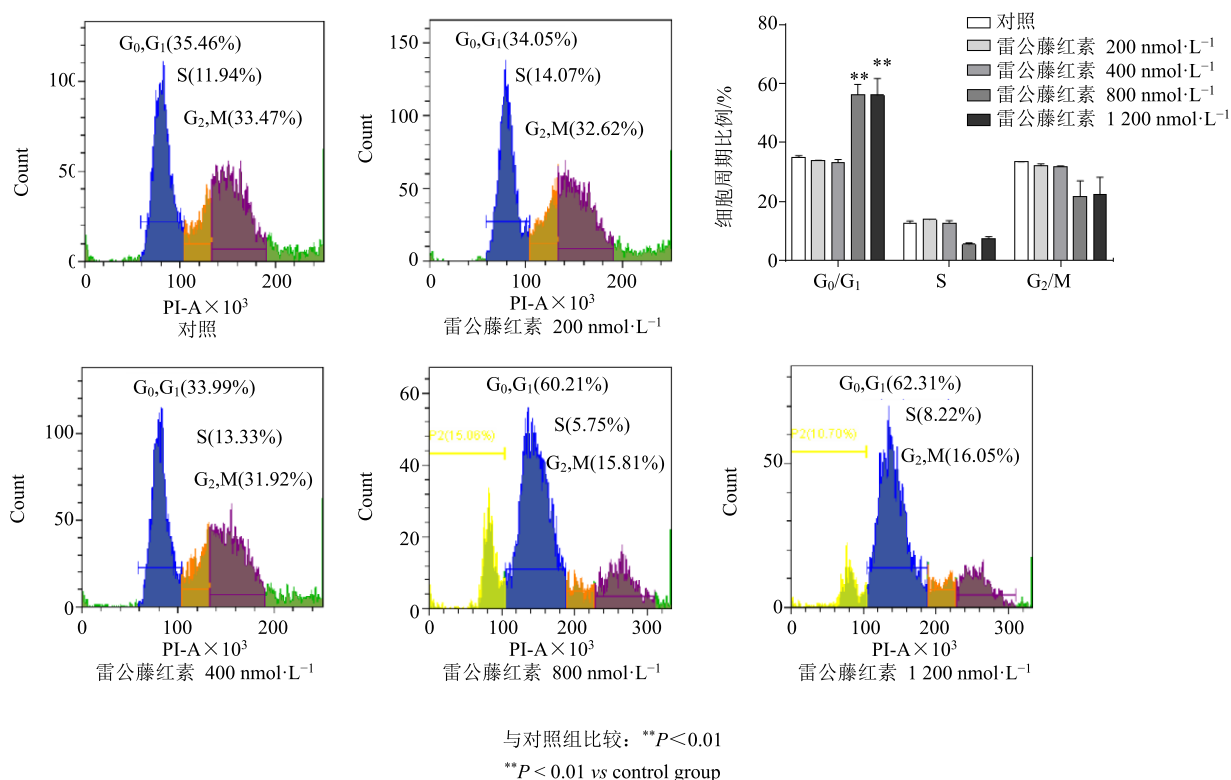
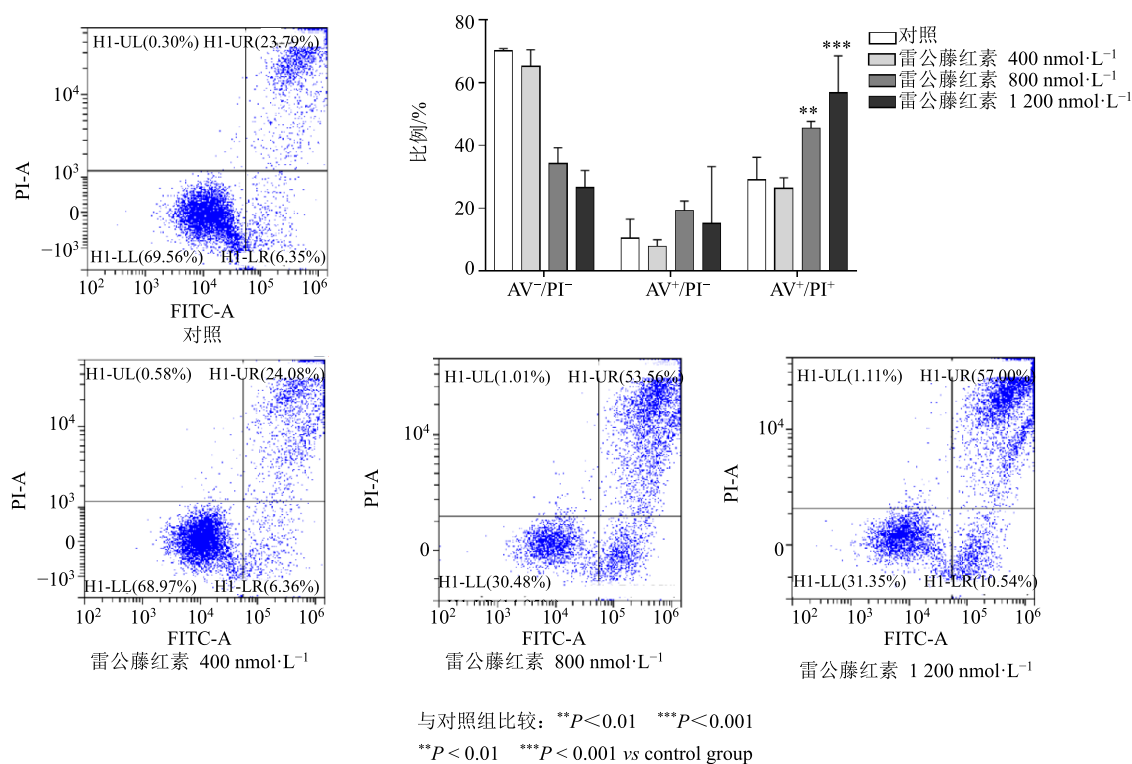


图 3 雷公藤红素对 HIBEC 细胞迁移能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effects of celastrol on cell migration of HIBEC ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

图 4 雷公藤红素对 HIBEC 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 4 Effects of celastrol on cell cycle of HIBEC ($\bar{x} \pm s, n = 6$)图 5 雷公藤红素对 HIBEC 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 5 Effects of celastrol on cell apoptosis of HIBEC ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

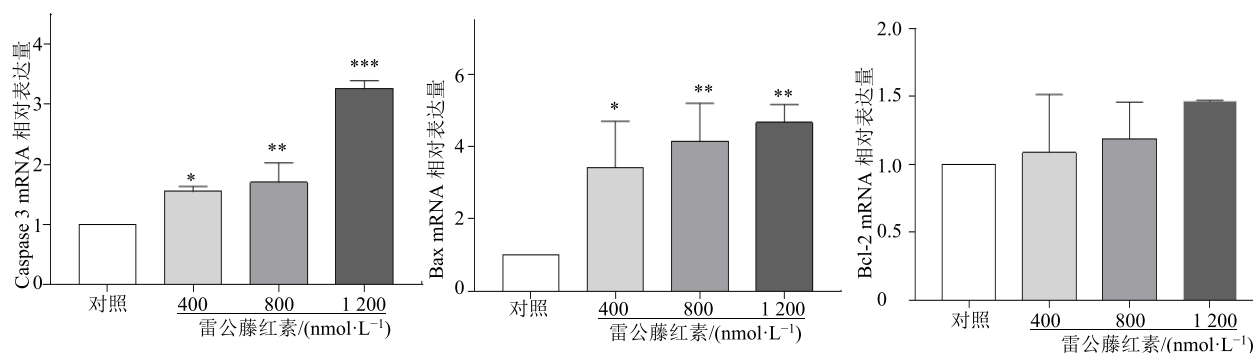
3.6 对 HIBEC 细胞 Caspase-3、Bax、Bcl-2 基因表达的影响

雷公藤红素对 HIBEC 细胞 Caspase-3、Bax、Bcl-2 基因表达的影响结果见图 6，与对照组相比，给药组 Caspase-3、Bax 基因的表达式显著增加，且具有良好的浓度依赖性 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结果显示雷公藤红素给药后上调细胞凋亡相关基因

的表达式，激活细胞凋亡。

3.7 对 HIBEC 细胞 Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达量的影响

雷公藤红素给药后 HIBEC 细胞内 Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达水平见图 7，与对照组相比，给药组 Caspase-3、Bax 的表达式显著增加，Bcl-2 蛋白表达式降低。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 图 7 同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as figure 7

图 6 雷公藤红素对 HIBEC 细胞 Caspase-3、Bax、Bcl-2 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effects of celastrol on mRNA expression of Caspase-3, Bax and Bcl-2 in HIBEC ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

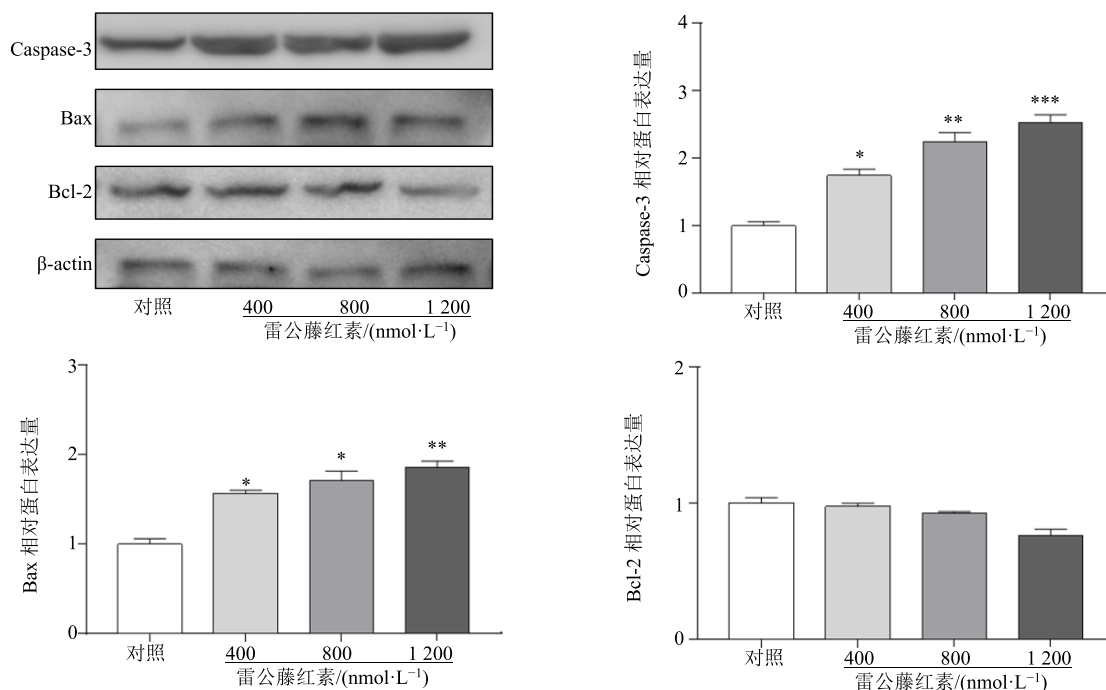


图 7 雷公藤红素对 HIBEC 细胞 Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Effects of celastrol on protein expression of Caspase-3, Bax and Bcl-2 in HIBEC ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

本研究结果显示，雷公藤红素在 400~2 000 nmol/L 下可抑制胆管细胞增殖且浓度依赖性良好；

在 400~800 nmol/L 下可抑制胆管细胞迁移且有较好的浓度依赖性；在 800、1 200 nmol/L 浓度下可将细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期，通过上调 Bax、

Caspase-3 凋亡相关通路基因和蛋白的表达诱导胆管细胞凋亡。

雷公藤红素在 1~10 $\mu\text{mol/L}$ 通过诱导肝癌细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用,在 100~1 000 nmol/L 通过抑制炎症因子生成发挥抗炎作用^[15-16]。另一方面在雷公藤红素对原代大鼠肝细胞毒性的研究中,肝细胞活性出现显著降低的最低药物浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$,因此在雷公藤红素的药效区间不会对肝细胞产生损伤。然而,本研究结果显示在 400 nmol/L 浓度下雷公藤红素已对胆管细胞产生损伤。综合以上结果分析,临床中雷公藤红素治疗炎症性疾病时,应优先考虑未出现胆管毒性的剂量,但较低浓度给药的具体方案仍需进一步研究。在抗肿瘤应用中,应重点考虑雷公藤红素的毒性作用,在用药的同时增加肝脏保护剂。

雷公藤红素在雷公藤饮片中的质量分数为 3~10 mg/g^[17-19]。在临床中雷公藤饮片剂量应不超过 30 mg/d^[20],雷公藤多苷片剂量为 1~1.5 mg/(kg·d)。结合目前雷公藤红素的药动学研究^[21-22],雷公藤红素在 Beagle 犬中的暴露量参数: C_{max} 为 35.6 $\mu\text{g/L}$, AUC_{0-12} 为 131.2 mL· $\mu\text{g/h}$, t_{max} 为 2.6 h, $t_{1/2}$ 为 2.9 h^[22]。在大鼠中的暴露量参数: C_{max} 为 0.8 $\mu\text{g/mL}$, AUC_{last} 为 45.6 h· $\mu\text{g/mL}$, AUC_{tot} 为 56.2 h· $\mu\text{g/mL}$, $t_{1/2}$ 为 41.8 h。折合相关剂量,最大血药浓度已大于 400 nmol/L,因此在体内最大血药浓度时,可能已出现胆管细胞毒性。

在本研究中,雷公藤红素在 400~2 000 nmol/L 浓度下对胆管细胞已表现出抑制增殖、抑制迁移、阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡的一系列损伤和破坏作用。然而在已有文献中,相同剂量下原代肝细胞却未见细胞损伤。对文献调研和研究结果进行分析后,笔者在此提出两方面思考:对于雷公藤红素而言,其肝损伤过程是否是由胆管细胞损伤进而破坏胆管结构、损伤肝细胞最终表现出肝毒性,胆管细胞对雷公藤红素的毒性耐受力远低于肝细胞的原因是否由于胆管细胞的结构、位置、数量与肝细胞不同,高剂量下的肝细胞损伤是否受胆管细胞凋亡及胆管破坏后的信号调控。另一方面,对于其他中药及其有效成分引发的药源性肝损伤是否也始于胆管细胞,以上思考为雷公藤红素的后续研究和中药药源性肝损伤的进一步探索提供了方向和思路的参考。

综上所述,本研究为雷公藤红素的临床用药提

供了剂量范围参考和基础数据支撑,对其他中药及天然药物的肝毒性造成的药源性肝胆损伤研究也具有一定的提示意义。

参考文献

- [1] Li X J, Jiang Z Z, Zhang L Y. Triptolide: Progress on research in pharmacodynamics and toxicology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(1): 67-79.
- [2] 贾路路, 谭亲友. 雷公藤红素抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(10): 1260-1264.
- [3] 辛文好, 韦珍妮, 张颖, 等. 雷公藤红素对巨噬细胞焦亡的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(5): 1087-1091.
- [4] Chen G, Zhang X, Zhao M, et al. Celastrol targets mitochondrial respiratory chain complex I to induce reactive oxygen species-dependent cytotoxicity in tumor cells [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11(14): 170-183.
- [5] Zhang R, Chen Z, Wu S S, et al. Celastrol enhances the anti-liver cancer activity of Sorafenib [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25(1): 4068-4075.
- [6] Han L P, Sun B, Li C J, et al. Effect of celastrol on tolllike receptor 4 mediated inflammatory response in free fatty acid induced HepG2 cells [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(4): 2053-2061.
- [7] Wang Y, Li C, Gu J, et al. Celastrol exerts anti-inflammatory effect in liver fibrosis via activation of AMPK-SIRT3 signalling [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(1): 941-953.
- [8] Guo J, Wang Y, Wang N, et al. Celastrol attenuates intrahepatic cholestasis of pregnancy by inhibiting matrix metalloproteinases-2 and 9 [J]. *Ann Hepatol*, 2019, 18(1): 40-47.
- [9] Li X, Sun R, Liu R. Natural products in licorice for the therapy of liver diseases: Progress and future opportunities [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 144(4): 210-226.
- [10] Li R, Dong J, Bu X Q, et al. Interleukin-6 promotes the migration and cellular senescence and inhibits apoptosis of human intrahepatic biliary epithelial cells [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(2): 2135-2143.
- [11] Jin C, Wu Z, Wang L, et al. CYP450s-activity relations of celastrol to interact with triptolide reveal the reasons of hepatotoxicity of *Tripterygium wilfordii* [J]. *Molecules*, 2019, 24(11): 2162-2178.
- [12] Liu R, Li X, Qiang X, et al. Taurocholate induces cyclooxygenase-2 expression via the sphingosine 1-phosphate receptor 2 in a human cholangiocarcinoma cell line [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(52): 30988-31002.
- [13] Poon R Y. Cell cycle control: A system of interlinking oscillators [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1342(1): 3-19.

- [14] 黄 燕, 付景丽. 黄芩素通过激活 Caspases 和 Bcl-2 家族蛋白诱导卵巢癌 HO-8910 细胞凋亡 [J]. 中草药, 2019, 50(11): 2620-2624.
- [15] 张登海, 杨春欣, 秦万章, 等. 雷公藤红素研究 20 年回顾 [A] // 第四次全国雷公藤学术会议汇编 [C]. 上海: 中国中西医结合学会, 2004.
- [16] 张登海. 雷公藤红素研究的现状和展望 [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(3): 266-267.
- [17] 库尔班江, 张 焱. 雷公藤药材中雷公藤红素的高效液相色谱法测定 [J]. 西北药学杂志, 2008, 23(2): 82-84.
- [18] 付恩桃, 刘修树, 胥振国, 等. RP-HPLC 法测定雷公藤根心与根皮中雷公藤红素的含量 [J]. 广州化工, 2018, 46(15): 116-117.
- [19] 江 静, 杨 臣. 不同部位、来源雷公藤药材的雷公藤红素含量比较 [J]. 亚太传统医药, 2019, 15(5): 65-67.
- [20] 李瑞林. 雷公藤临床安全合理运用经验 [J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(8): 567-568.
- [21] Wang Z, Chen D, Wang Z. Effects of diclofenac on the pharmacokinetics of celastrol in rats and its transport [J]. *Pharm Biol*, 2018, 56(1): 269-274.
- [22] 张 军, 刘史佳, 胡杰慧, 等. Beagle 犬口服雷公藤片血浆中雷公藤红素 LC-MS/MS 测定及药动学研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(14): 2727-2731.