

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.17.002

雷公藤甲素诱导小鼠急性肝损伤的形态学研究*

刘泽洲¹ 许可嘉¹ 张天娇¹ 易小烈² 赵福建¹ 杨美娟¹ 牛建昭¹ 李健^{1△}

(1 北京中医药大学基础医学院细胞生物化学实验室 北京 100029; 2 贵州省黔西县中心医院 贵州 毕节 551500)

摘要 目的:观察雷公藤甲素诱导小鼠急性肝损伤的形态学特征,为进一步研究雷公藤甲素肝毒性的病理特点和毒理机制提供基础。**方法:**昆明种小鼠以雷公藤甲素 LD50 剂量(0.8 mg/kg)水溶液灌胃,分别于给药 12 h 及 24 h 后取肝组织,制备石蜡切片、冰冻切片,行常规 HE 染色、PCNA 染色、TUNEL 染色及光镜观察。部分肝组织经戊二醛固定、制备超薄切片,行透射电镜下观察。PCNA 及 TUNEL 染色结果采用图像分析软件进行定量分析及统计学处理。**结果:**0.8 mg/kg 雷公藤甲素灌胃后 12 h 即可诱导肝组织炎细胞浸润、结构破坏、肝细胞坏死及代偿性增生。透射电镜下可见肝细胞内细胞骨架结构异常、细胞器大量脱落、自噬体明显增多。PCNA 及 TUNEL 染色结果表明,雷公藤甲素可诱导肝细胞出现显著的增殖及凋亡。**结论:**雷公藤甲素可诱导肝组织炎症反应发生,同时伴随肝细胞凋亡、坏死及代偿性增生。推测肝细胞自噬性凋亡是雷公藤甲素诱导急性肝损伤的关键病理环节。

关键词:雷公藤甲素;小鼠;急性肝损伤;形态学;自噬性凋亡

中图分类号:Q95-3;R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)17-3207-05

The Morphological Study on Acute Liver Injury of Mice Induced by Triptolide*

LIU Ze-zhou¹, XU Ke-jia¹, ZHANG Tian-jiao¹, YI Xiao-lic², ZHAO Fu-jian¹, YANG Mei-juan¹, NIU Jian-zhao¹, LI Jian^{1△}

(1 Cell & Biochemistry Lab, School of basic medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China;

2 Qianxi County Central Hospital, Bijie, Guizhou, 551500, China)

ABSTRACT Objective: To observe the morphological characteristics of acute liver injury induced by triptolide in mice, and provide the basis of pathological characteristics and toxicological mechanisms of triptolide in liver for our further research. **Methods:** Kunming mice were given triptolide orally according to median lethal dose (LD50), and dissected after 12 and 24 hours separately. Liver tissue were detected by HE, PCNA and TUNEL staining and transmission electron microscope. Then images were analyzed by image analysis software and the data was analyzed by statistical software. **Result:** After treated with 0.8 mg/kg of triptolide for 12 hours, liver tissue was inflamed and destroyed, hepatocyte necrosis and compensatory hypertrophy can be observed. The transmission electron microscope images show the cytoskeleton was abnormal, organelles were dropped and autophagosomes were increased. **Conclusion:** Triptolide can induce inflammatory reaction, accompanied by apoptosis, necrosis and compensatory hyperplasia in liver. We speculated that autophagic cell death induced by triptolide may be the key pathological factor for acute liver injury.

Key words: Triptolide; Mice; Acute liver injury; Morphology; Autophagic cell death

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R285.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)17-3207-05

前言

雷公藤(Tripterygium Wilfordii Hook. f.)为卫矛科植物,以根入药,苦、辛、凉,有大毒,是已有报道中发生不良反应事件最多的中药之一,也是单味药中肝毒性最严重的中药之一^[1],其不良反应的临床特征为肝肿大、胆汁淤积、肝细胞脂肪样变、肝细胞凋亡及坏死等^[2,3]。

已有的研究表明,雷公藤中主要活性物质是雷公藤甲素(Triptolide)^[4],又名雷公藤内酯醇,属环氧化二萜内酯化合物,

具有抗炎、免疫抑制、抗肿瘤等多种生物活性^[5-7]。动物实验表明,雷公藤甲素对肿瘤、类风湿关节炎、糖尿病肾病等均具有较好的疗效,是国内外着重研究的天然产物之一。然而,雷公藤甲素还具有较强的毒副作用(如肝损伤、肾损伤等)^[8,9],这在一定程度上限制了该药的临床应用及深度开发。因此,本实验采用致毒剂量的雷公藤甲素对小鼠进行单次灌胃以诱发其急性肝损伤,采用光镜、电镜等形态学方法检测肝组织、细胞学特征,以期深入探究雷公藤甲素肝毒性的病理特点及毒理机制提供基础,为雷公藤甲素能够最终应用于临床提供相应的线索与

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81273884)

作者简介:刘泽洲(1986-),男,硕士研究生,主要研究方向:肝病的中医药防治,E-mail:849009072@qq.com

△通讯作者:李健(1970-),副教授,博士,主要研究方向:药物性肝损伤的分子机制,E-mail:lijian@bucm.edu.cn

(收稿日期:2015-01-09 接受日期:2015-01-27)

资料。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

6 周龄雄性昆明种小鼠,购自北京维通利华实验动物公司(SCXK-京-2012-0001)。雷公藤甲素,购自南京泽朗医药科技有限公司(纯度 $\geq 98\%$)。细胞增殖核抗原 PCNA 试剂盒, 购自 Protein Tech 公司(批号 10205-2-AP)。TUNEL 试剂盒,购自霍夫曼-罗氏公司(批号 14590300)。哈瑞氏苏木素染色液及伊红 Y 染色液,购自北京益利精细化学品有限公司。其余常规试剂、耗材均购自北京百诺威生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及处置 将雄性昆明种小鼠(SPF级)30只(20 ± 5 g)随机分为3组:正常组、12 h 损伤组、24 h 损伤组,每组10只。依照文献及本实验室前期预实验结果^[10],全部小鼠适应性喂养7天后进行实验:12 h 损伤组、24 h 损伤组均于首日8时按小鼠体重以雷公藤甲素水溶液 0.8 mg/kg 剂量灌胃,给药容积为 0.2 mL/10g 体重,正常组予以相同体积生理盐水灌胃处理。实验期间,各组小鼠均饲喂普通维持饲料,自由摄食饮水,观察进食、二便、活动、毛发等情况。12 h 损伤组于当日20时取材,24 h 损伤组及正常组于次日8时取材。实验小鼠经称重、麻醉(10%水合氯醛,0.035 mL/kg)、腹主动脉放血后,取相同部位肝组织,所取肝组织分为三部分,分别以4%多聚甲醛溶液固定后经脱水、透明、浸蜡、包埋并制备石蜡切片(4 μ m),OCT包埋剂包埋冷冻后制备冰冻切片(10 μ m),3%戊二醛溶液固定后经脱水、包埋、修块并制备超薄切片(60 nm)。

1.2.2 指标检测 石蜡切片按常规操作方法经脱蜡、复水后行HE染色,依照试剂盒说明书步骤进行PCNA显色;冰冻切片依照试剂盒说明书步骤进行TUNEL染色。石蜡及冰冻切片行相应染色后经光镜观察并摄片。超薄切片经电子染色、透射电镜观察并摄片。

1.3 统计学处理

PCNA及TUNEL的染色结果在光镜下用相同放大倍数、相同观察条件,经5点采样法摄片。各组图片用ImagePro Plus 6.0 图像分析软件作图像分析,计量单位面积内的阳性细胞数

及积分光密度。定量数据采用SPSS17.0 软件作统计学分析。对符合正态分布且方差齐性的计量资料组间比较采用ANOVA 单因素方差分析,组间差异以表示, $P < 0.05$ 表示组间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学观察及存活率统计结果

预实验结果显示,雷公藤甲素灌胃4 h后,大量小鼠出现自发活动减少、共济失调等症状;16 h后部分小鼠呼吸障碍、口唇颜色紫黑;给药后18 h左右出现第一例小鼠死亡情况;给药后38 h左右有半数小鼠死亡,具体结果见图1。对死亡小鼠尸检发现,胃肠黏膜充血,肝脏颜色灰暗、表面呈明显颗粒状。未死亡小鼠毒性反应逐渐消失,48 h后大部分小鼠恢复自主活动及正常进食、进水行为。

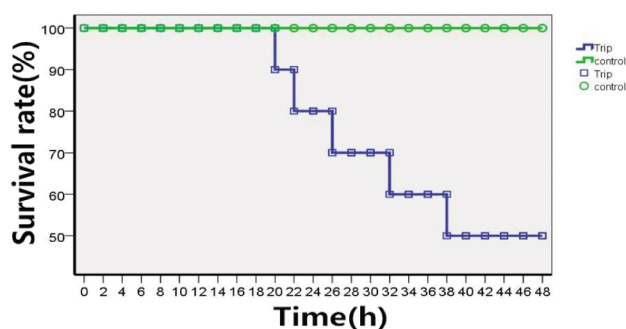


图1 0.8 mg/kg 雷公藤甲素急性毒性实验结果(n=20)

Fig. 1 The acute toxicity experiment result of Triptolide 0.8 mg/Kg(n=20)

2.2 小鼠肝组织石蜡切片 HE 染色光镜观察结果

肝组织病理学观察结果表明,正常对照小鼠肝组织着色均匀、肝小叶结构清晰、肝索排列整齐、肝细胞形态完好(图2-A)。雷公藤甲素12 h 损伤组小鼠肝组织呈嗜碱性,肝细胞损伤多见于肝腺泡I区,以肝细胞肿胀、泡沫样变及少量坏死为主,局部区域出现炎性细胞浸润(图2-B)。雷公藤甲素24 h 损伤组肝组织同样呈嗜碱性,肝小叶普遍出现肝细胞损伤,且以中央静脉周围(肝腺泡III区)肝细胞坏死最为严重,且出现大量炎性病灶(图2-C)。

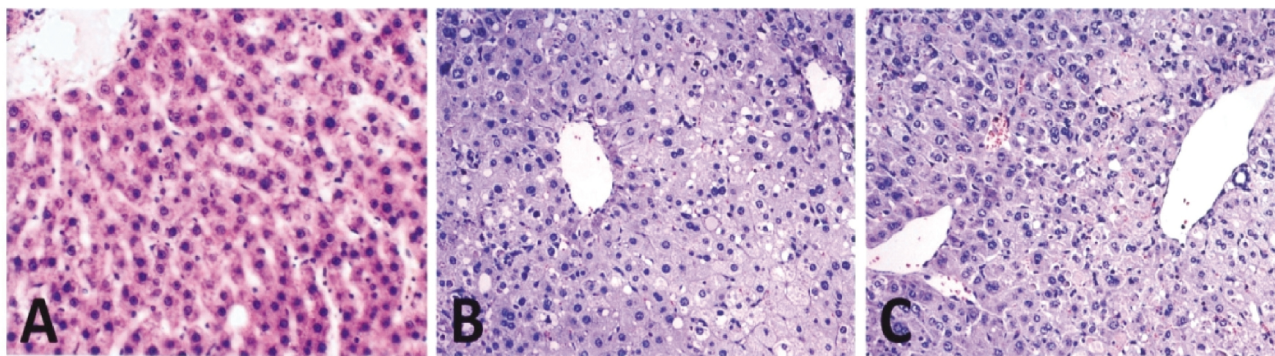


图2 小鼠肝组织石蜡切片 HE 染色光镜观察($\times 100$)

Fig. 2 Optical microscope observation of HE staining of mice liver tissue paraffin sections ($\times 100$)

A: 正常对照组 B: 12 h 损伤组 C: 24 h 损伤组

A: normal group B: 12 h injury group C: 24 h injury group

2.3 小鼠肝组织超薄切片透射电镜观察结果

透射电镜显示,正常组小鼠肝细胞电子染色均匀,细胞器结构清晰、完整(图 3-A)。12 h 损伤组小鼠肝细胞骨架结构出

现异常,细胞器减少(脱落)、自噬体增多(图 3-B)。24 h 损伤组小鼠肝细胞内细胞器因大量脱落显著减少、细胞骨架损伤严重,部分胆小管出现肿大及连接结构损坏(图 3-C)。

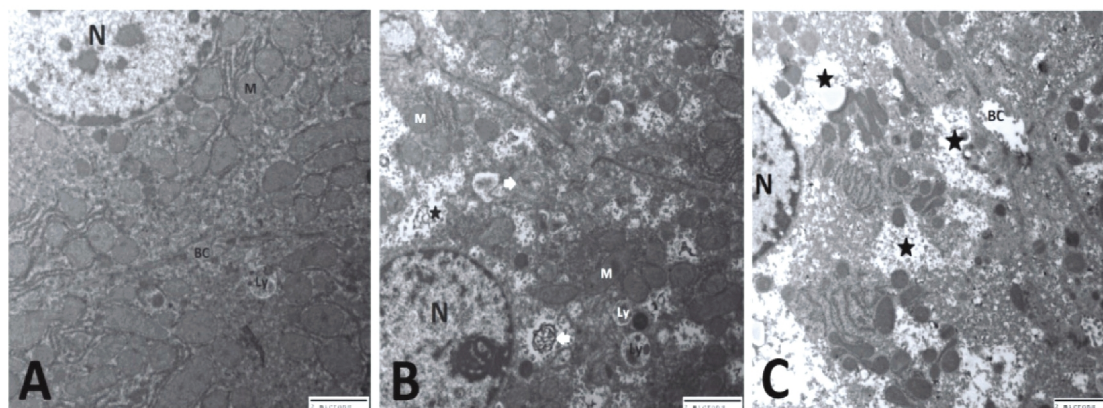


图 3 小鼠肝组织超薄切片透射电镜观察($\times 10000$)

Fig. 3 Transmission electron microscopy observation of mice liver tissue ultra-thin slicing

A: normal group B: 12 h injury group C: 24 h injury group

(Note: N-nucleus; M- mitochondria; BC-bile canaliculus; Ly-lysosome; $\Rightarrow$ -autophagosome; $\star$ -dropped organelles or necrosis).

2.4 小鼠肝组织石蜡切片 PCNA 显色光镜观察结果

PCNA 显色结果显示,正常组小鼠肝组织有少量细胞核呈棕黄色阳性反应(图 4-A);12 h 损伤组小鼠肝组织中出现大量阳性反应细胞核(图 4-B);24 h 损伤组小鼠肝组织中细胞核普遍发生阳性反应,大量细胞核呈深棕色强阳性反应(图 4-C)。

如图 4-D 所示,图像分析结果显示,与正常组比较,12 h 损伤组及 24 h 损伤组的单位面积阳性细胞数均显著高于正常组($P<0.01$);与 12 h 损伤组比较,24 h 损伤组的单位面积阳性细胞数显著升高($P<0.01$)。

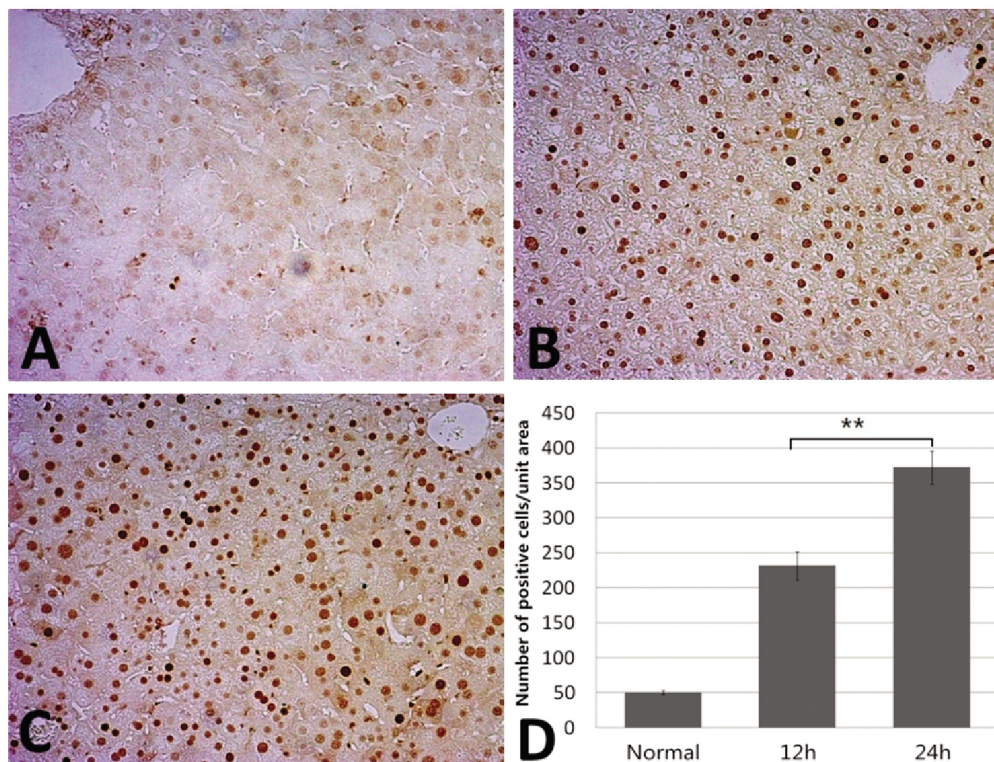


图 4 小鼠肝组织石蜡切片 PCNA 显色光镜观察($\times 100$)

Fig. 4 Optical microscope observation of PCNA staining of mice liver tissue paraffin sections ($\times 100$)

A: 正常对照组 B: 12h 损伤组 C: 24 h 损伤组 D: 图像分析结果

A: normal group B: 12 h injury group C: 24 h injury group D: image analysis result

2.5 小鼠肝组织冰冻切片 TUNEL 显色光镜观察结果

TUNEL 显色结果显示, 正常组小鼠肝组织未出现显著的棕黄色阳性反应区域(图 5-A);12 h 损伤组小鼠肝组织中有少量肝细胞核及非肝实质细胞的细胞核呈棕黄色阳性反应(图

5-B);24 h 损伤组小鼠肝组织中出现大量强阳性细胞核(图 5-C)。图像分析结果显示, 与正常组比较,12 h 损伤组及 24 h 损伤组的积分光密度值均显著高于正常组($P<0.01$);与 12 h 损伤组比较,24 h 损伤组的积分光密度值显著升高($P<0.01$)。

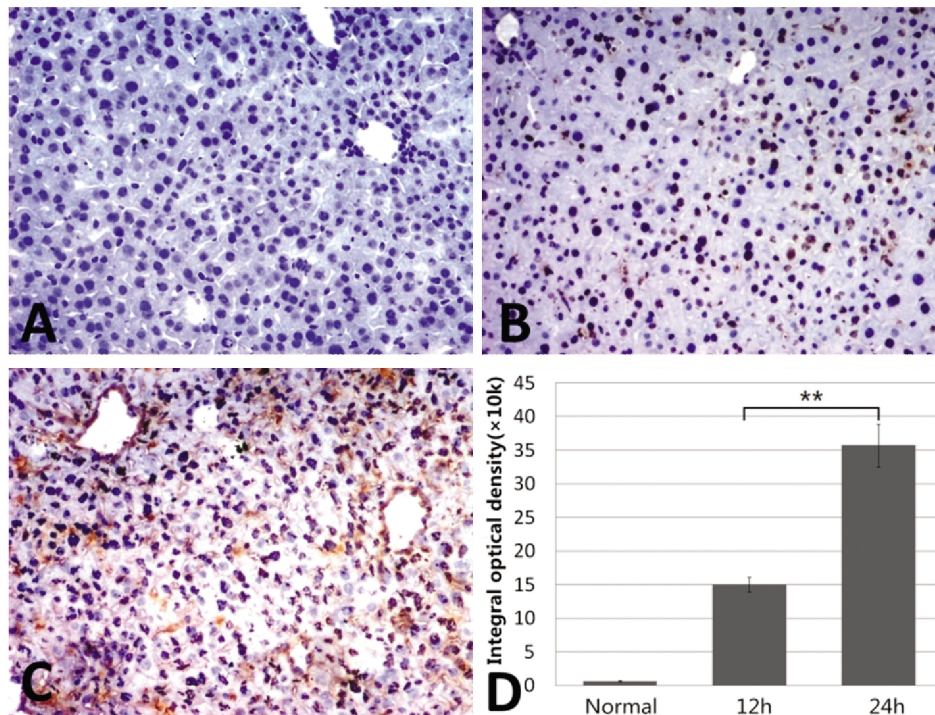


图 5 小鼠肝组织冰冻切片 TUNEL 显色光镜观察(× 100)

Fig. 5 Optical microscope observation of TUNEL staining of mice liver tissue frozen sections (× 100)

A: 正常对照组 B: 12 h 损伤组 C: 24 h 损伤组 D: 图像分析结果

A: normal group B: 12 h injury group C: 24 h injury group D: image analysis result

3 讨论

多项临床观察表明,雷公藤制剂在对类风湿关节炎及肿瘤等重大疑难疾病的疗效肯定^[11,12],这引起国内外研究者的高度关注,一致认为雷公藤制剂有望成为继青蒿素和银杏叶提取物之后的下一个被国际认可的天然药物制剂。然而,雷公藤制剂的毒副作用较大,限制了该药的深入开发和临床应用。2004 年至 2011 年,国家药品不良反应监测中心病例报告数据库中记录了涉及雷公藤多苷片病例 633 例、雷公藤片病例 201 例,主要表现为药物性肝损伤^[13]。

目前为止,已有大量的文献报道了有关雷公藤及其提取物的毒性研究,但观点不尽相同,部分基础研究数据仍需进一步验证。本课题组近年来围绕雷公藤提取物诱发肝损伤的机制开展了大量基础研究工作^[14,15],本实验着重观察致毒剂量(LD50 剂量)雷公藤甲素诱发急性肝损伤的形态学改变,结果表明 0.8 mg/kg 雷公藤甲素灌胃给药 12 小时后,肝细胞损伤集中出现在肝小叶边缘区(雷公藤甲素随血循环从小叶间动脉或小叶间静脉进入肝小叶,肝腺泡 I 区的细胞最先接触药物),提示这种损伤可能缘于雷公藤甲素对肝细胞的直接杀伤作用;给药 24 小时后,肝细胞损伤加剧且呈弥漫性分布,并以肝腺泡 III 区为主;给药 38 小时后,雷公藤甲素可导致半数小鼠死亡。透射电

镜观察发现,雷公藤甲素灌胃后,肝细胞骨架结构发生明显改变,细胞器降解、脱落及数量减少;且在给药 12 小时后,肝细胞内可观察到显著的自噬现象;在给药 24 小时后,肝细胞自噬体显著减少,而细胞器数量显著减少、细胞骨架结构损坏严重。

自噬是细胞维持自身内环境稳定、对抗危险因素的主动性保护机制^[16]。已有的研究表明,肝细胞在缺氧、中毒等应激状态下可通过诱导自噬形成细胞自我保护的“挽救”模式,而这种主动的保护作用可以有效阻止细胞凋亡及坏死的发生^[17],从而防止或减轻肝组织损伤。然而,在伴刀豆球蛋白 A(Con A)诱导小鼠急性肝损伤模型中,自噬则是促进细胞凋亡或坏死的主要病理机制之一^[18];为此,本实验进一步观察了雷公藤甲素对肝细胞增殖和凋亡的影响,结果表明给药 24 h 后,肝细胞增殖与凋亡均显著高于 12 h 损伤组,这提示自噬性凋亡及坏死(autophagic cell death and necrosis)是雷公藤甲素诱导急性肝损伤的关键病理特征。

而在实际临床应用中,雷公藤制剂(如雷公藤多苷片)中雷公藤甲素的含量相对较低,尚未发现急性肝损伤的典型病例。已有的资料多见服用雷公藤多苷片 4 周左右出现黄疸、皮疹、瘙痒等胆汁淤积性肝炎的不良反应^[19]。禄保平等^[20]用雷公藤多苷灌胃制备小鼠急性肝损伤模型,结果表明:135 mg/kg 雷公藤多苷片(相当于 20 倍临床用量)灌胃给药 18 小时后,小鼠可出

现肝细胞广泛损伤、大量肝细胞凋亡、肝细胞超微结构异常(细胞器数量减少、线粒体及内质网肿胀或囊泡化)。本实验的结果与上述报道基本吻合,进一步证实了雷公藤制剂的肝毒性存在剂量依赖性,其肝损伤的病理机制与多途径诱导肝细胞凋亡相关联。本研究的初步结果表明,雷公藤甲素诱导肝细胞自噬性凋亡及坏死可能是雷公藤制剂致肝损伤的启动因素。目前,本课题组正在开展相关的分子机制研究,希望揭示雷公藤肝毒性的科学内涵,并为雷公藤甲素这一具有多种生物活性的天然产物能够应用于临床做出贡献。

参考文献(References)

- [1] 2012年上半年国家食品药品监督管理局公告要求加强安全性管理的药品[R]. 药学进展, 2012, 36(7): 336
The announcement to strengthen the safety management of drugs in the first half in 2012 required by state food and drug administration [R]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 2012, 36(7): 336
- [2] 柴智, 周文静, 高丽, 等. 雷公藤肝毒性及其作用机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 7(17): 243-246
Chai Zhi, Zhou Wen-jing, Gao Li, et al. Experimental Progress of Liver Toxicity of Tripterygium wilfordii and Its Mechanism [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2011, 7(17): 243-246
- [3] 周聪, 周玲玲, 周学平. 中药配伍雷公藤减肝毒性机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2014, (4): 1167-1169
Zhou Cong, Zhou Ling-ling, Zhou Xue-ping. Study on the mechanism of attenuating hepatotoxicity of Tripterygium wilfordii through compatibility [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2014, (4): 1167-1169
- [4] Zhou ZL, Yang YX, Ding J, et al. Triptolide: structural modifications, structure-activity relationships, bioactivities, clinical development and mechanisms[J]. Natural product reports, 2012, 29(4): 457-475
- [5] Wong KF, Yuan Y, Luk JM, et al. Tripterygium wilfordii bioactive compounds as anticancer and anti-inflammatory agents [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2012, 39(3): 311-320
- [6] Liu Q. Triptolide and its expanding multiple pharmacological functions[J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(3): 377-383
- [7] Li XJ, Jiang ZZ, Zhang LY. Triptolide: Progress on research in pharmacodynamics and toxicology[J]. Ethnopharmacol, 2014, 155(1): 67-79
- [8] Wang J, Jiang Z, Ji J, et al. Gene expression profiling and pathway analysis of hepatotoxicity induced by triptolide in Wistar rats[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 58(4): 495-505
- [9] 王贝, 江振洲, 张陆勇. 雷公藤甲素毒性及减毒的研究进展[J]. 药物评价研究, 2012, 35(3): 211-215
Wang Bei, Jiang Zhen-zhou, Zhang Lu-yong. Advances in studies on toxicity and attenuation of triptolide [J]. Drug Evaluation Research, 2012, 35(3): 211-215
- [10] 丁虹, 吴建元, 童静, 等. 雷公藤甲素急性毒性及其机制研究[J]. 中药材, 2004, 27(2): 115-118
Ding Hong, Wu Jian-yuan, Tong Jing, et al. Research on the acute toxicity of Triptolide and its mechanism [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2004, 27(2): 115-118
- [11] Goldbach-Mansky R, Wilson M, Fleischmann R, et al. Comparison of Tripterygium wilfordii Hook F versus sulfasalazine in the treatment of rheumatoid arthritis: a randomized trial [J]. Annals of internal medicine, 2009, 151(4): 229-240
- [12] Lv Q W, Zhang W, Shi Q, et al. Comparison of Tripterygium wilfordii Hook F with methotrexate in the treatment of active rheumatoid arthritis (TRIFRA): a randomised, controlled clinical trial [J]. Annals of the rheumatic diseases, 2014, 73(10): 1136
- [13] 关注雷公藤制剂的用药安全[J]. 中国现代应用药学, 2012, 4(29): 4
Paying attention to safety of tripterygium wilfordii agents[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2012, 4(29): 4
- [14] Jian Li, Yongheng Lu, Cheng Xiao, et al. Comparison of toxic reaction of Tripterygium wilfordii multiglycoside in normal and adjuvant arthritic rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 135(2): 270-277
- [15] 李健, 谭勇, 吕永恒, 等. 雷公藤多苷对正常及佐剂关节炎大鼠睾丸组织形态结构、NOS表达影响的比较研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(2): 153-157
Li Jian, Tan Yong, Lv Yong-heng, et al. Comparative study on effect of poly glycosides of Tripterygium wilfordii Hook on morphology of testicles and expression of NOS in normal and adjuvant-induced arthritis rats [J]. Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine, 2011, 17(2): 153-157
- [16] Ryter SW, Cloonan SM, Choi AM. Autophagy: A critical regulator of cellular metabolism and homeostasis[J]. Mol Cells, 2013, 36(1): 7-16
- [17] Ricky H Bhogal, Christopher J Weston, Stuart M Curbishley, et al. Autophagy, a cyto-protective mechanism which prevents primary human hepatocyte apoptosis during oxidative stress [J]. Autophagy, 2012, 8(4): 545-558
- [18] Yang MC, Chang CP, Lei HY. Endothelial cells are damaged by autophagic induction before hepatocytes in Con A-induced acute hepatitis[J]. Int Immunol, 2010, 22(8): 661-670
- [19] 柯坤宇. 雷公藤多苷片引起肝损伤一例报告 [J]. 实用临床医学, 2009, 10(7): 40-41
Ke Kun-yu. A case report of liver injury induced by tripterygium wilfordii glycosides tablets [J]. Practical Clinical Medicine, 2009, 10(7): 40-41
- [20] 禄保平, 苗明三, 杨晓娜. 应用雷公藤多苷灌胃建立小鼠急性肝损伤模型的研究[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(2): 75-78
Lu Bao-ping, Miao Ming-san, Yang Xiao-na. Study on the model of mice acute liver injury induced by tripterygium wilfordii glycosides tablets given orally [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2007, 23(2): 75-78