

丹皮酚对佐剂性关节炎大鼠继发性炎症的作用

杨小四¹, 姚文兵¹, 胡华麟¹, 刘毅^{2*}

(1. 安庆医药高等专科学校医学基础部, 安徽 安庆 246052; 2. 安庆医药高等专科学校药理学系, 安徽 安庆 246052)

摘要: **目的** 观察丹皮酚对佐剂性关节炎模型大鼠继发性炎症的作用及 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 表达变化。**方法** 成年 SD 大鼠, 随机分为对照组 (10 只) 和佐剂性关节炎造模组 (50 只), 注射弗氏完全佐剂建立佐剂性关节炎模型 12 d 后, 再随机分为模型组 (生理盐水)、SB203580 组 (2 mg/kg) 和丹皮酚低、中、高剂量组 (8、16、32 mg/kg), 灌胃给予相应药物干预 16 d, 每 4 d 采用多发性关节炎指数和继发性关节肿胀度评价丹皮酚对佐剂性关节炎大鼠影响, 采用 ELISA 法检测血清 IL-1 β 、IL-10、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平, 免疫组化染色观察踝关节 p38 MAPK 蛋白表达, RT-qPCR 和 Western blot 法检测继发性侧滑膜组织 p38 MAPK mRNA 和蛋白表达。**结果** 与对照组比较, 模型组多发性关节炎指数升高, 继发性关节肿胀显著, 丹皮酚各剂量组、SB203580 组大鼠关节炎指数与继发性关节肿胀降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 血清炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), IL-10 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), 继发性关节滑膜组织 p38 MAPK mRNA 和蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 丹皮酚可有效抑制佐剂性关节炎大鼠继发性关节炎, 其机制可能与抑制 p38 MAPK 表达有关。

关键词: 丹皮酚; 佐剂性关节炎; 炎症反应; p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK)

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)09-3000-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.09.047

类风湿性关节炎属于多关节累积的滑膜炎性病变, 炎症刺激关节滑膜增生, 新生血管形成, 但确切病因未明^[1]。丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路异常参与滑膜炎, 针对该信号通路设计药物靶点是目前治疗类风湿性关节炎的一个关注方向^[2-3]。目前, 临床类风湿性关节炎治疗中常用的抗风湿药、非甾体抗炎药和糖皮质激素等均有一定局限性, 生物制剂大多价格昂贵^[4-5]。天然中草药提取物因其在抗风湿中具有一定疗效, 价廉且副作用小而广泛应用于类风湿性关节炎治疗^[6]。毛茛科植物牡丹皮的提取物丹皮酚具有消炎作用, 有文献报道, 其对实验动物关节炎有抑制作用, 可以抑制致炎细胞因子产生^[7], 但其机制并不确定。佐剂性关节炎动物模型为免疫性关节炎模型, 其病程中动物表现的症状和病理变化类似于类风湿性关节炎, 被广泛应用于类风湿性关节炎研究^[8]。本研究通过构建佐剂性关节炎大鼠模型, 观察丹皮酚对佐剂性关节炎大鼠关节滑膜组织中 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 表达的影响, 探讨丹皮酚改善佐剂性关节炎大鼠关节功能的部分机制, 为中药丹皮酚治疗类风湿性关节炎提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 健康成年雄性 SD 大鼠 60 只, 体质量 (210 $\pm$ 10) g, 购买并饲养于安徽省动物实验中心, 实验动物生产

许可证号 SCXK (皖) 2017-001, 每笼 5 只, 饲养环境为相对湿度 (50 $\pm$ 5)%, 温度 (25 $\pm$ 2)℃, 采取灯光照明, 明暗 12 h/12 h 交替, 饲喂颗粒食用饲料, 自由饮水。本实验经安徽省动物实验伦理委员会批准 (伦理审查号 AH.20190903c0600105)。

1.2 试剂与药物 丹皮酚 (纯度>99%, 成都瑞芬思生物科技有限公司, 批号 552-41-0)。p38 MAPK 抑制剂 SB203580 (美国 Cayman 公司, 批号 13067-5); 弗氏完全佐剂 (freunds complete adjuvant, FCA) (浙江联硕生物科技有限公司, 批号 F5881); 水合氯醛 (山东济南嘉格生化科技有限公司, 批号 312-07-3); 大鼠 IL-1 β 、IL-10、TNF- α 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (上海格敏生物科技有限公司, 批号 KB1822、KB3911、KB2720); 苏木精 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 H8070); TRIzol (美国 Invitrogen 公司, 批号 19206038); PCR 逆转录试剂盒 (美国 Gene Copoeia 公司, 批号 2037901801); 羊抗鼠 p38 MAPK 抗体、羊抗鼠 β -actin 抗体 (美国 Santa Cruz 公司, 批号 SC00238、SC69879); 二抗兔抗羊辣根过氧化物酶标记免疫球蛋白 (Ig) G (北京华美生物技术公司, 批号 2020-07-29); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号 AR0146)。

1.3 仪器 病理切片机 (德国 Leica 公司, 型号

收稿日期: 2021-08-10

基金项目: 安徽省教育厅高校自然科学研究重点项目 (KJ2019A1234); 安徽省教育厅质量工程重大教学研究项目 (2020jyxm1116)

作者简介: 杨小四 (1979—), 男, 副教授, 从事解剖学及药理学研究。Tel: 18155666925, E-mail: 383452723@qq.com

*通信作者: 刘毅 (1975—), 教授, 从事中药药理学研究。Tel: 18055668053, E-mail: aqly6776@sina.com

RM2235); 高速冷冻离心机(美国 Eppendorf 公司, 型号 55362R); 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司, 型号 olympusix71); 酶标仪(美国 Wisdom 公司, 型号 6500); 实时荧光定量 PCR 仪(德国 Roche 公司, 型号 LightCycler96)。

2 方法

2.1 动物分组、造模、给药及标本处理 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 按随机数字表分为对照组(10 只)和佐剂性关节炎造模组(50 只)。佐剂性关节炎动物模型制备依据文献[9]报道, 在大鼠左后肢足趾皮下注射 FCA 0.1 mL, 对照组注射等容量生理盐水。致炎 12 d 后, 50 只造模组再随机均分为模型组(生理盐水), 丹皮酚低、中、高剂量组(8、16、32 mg/kg), SB203580 组(2 mg/kg), 每组 10 只, 灌胃给予相应剂量药物, 对照组灌胃给予等量生理盐水, 连续 16 d。腹腔注射水合氯醛进行麻醉, 抽取 5 mL 股动脉血, 6 000 r/min 离心 10 min, 分离得到血清, 于 -20 ℃ 冰箱保存。每组取 3 只大鼠踝关节做形态学研究, 另 7 只踝关节滑膜组织作分子生物学研究。

2.2 继发性关节炎的症状判定 根据课题组前期报道^[10], 致炎 12 d 开始, 每 4 d 观察并记录继发性关节改变情况。主要观察指标为①关节肿胀度, 采用容积测量仪, 排水法检测大鼠右后肢(非致炎侧)踝关节容积改变, 公式为踝关节容积改变(Δ mL) = 致炎后右后肢容积 - 致炎前右后肢容积。②关节炎指数, 采用双盲法三人观察计分, 计算除致炎侧外其它关节情况, 0 分, 关节无明显结构变化; 1 分, 某 1 个肢体关节轻微肿胀或有红斑; 2 分, ≥ 2 个肢体关节轻微肿胀或有红斑; 3 分, ≥ 2 个肢体关节肿胀或红斑; 4 分, ≥ 2 个肢体关节明显肿胀, 站立不稳, 计算 3 个关节累计得分, 最高 12 分。

2.3 ELISA 法检测细胞因子水平 取大鼠血清, 严格按照酶联免疫吸附试剂盒说明书配置标准品和检测溶液, 根据操作步骤检测血清 IL-1 β 、TNF- α 、IL-10 水平, 酶标仪检测波长为 450 nm 的吸光度(A)值。

2.4 踝关节 p38 MAPK 单克隆抗体免疫组化病理学检查 10% 福尔马林充分固定踝关节后, 经脱钙、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片, 得到石蜡切片, 脱蜡后微波抗原修复, H₂O₂ 室温避光作用以消除内源性过氧化物酶, 山羊血清封闭, 滴加一抗羊抗鼠 p38 MAPK 单克隆抗体(1:300) 50 μ L, 4 ℃ 孵育过夜, 次日滴加 50 μ L 兔抗羊辣根过氧化物酶标记免疫球蛋白(Ig)G 二抗染液, DAB 显色, 苏木精复染细胞核, 经乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂封片后镜检, 阴性对照采用 PBS 代替一抗染色, 细胞质(或核)呈黄色或棕黄色为阳性显色。采集图像, 南京捷达 JD80i 软件分析图像, 参照文献[10]报道计算 p38 MAPK 阳性细胞吸光度(A)值。

2.5 RT-qPCR 检测 p38 MAPK mRNA 表达 取冻存大鼠滑膜组织块并剪碎, 采取 TRIzol 法提取 RNA, 检测 RNA 浓度。严格按照反转录试剂盒说明书, 将 mRNA 反转录为

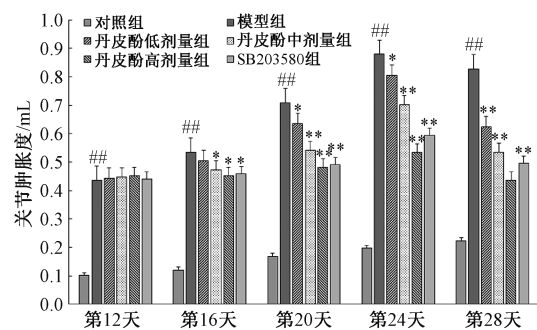
cDNA, PCR 引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成, p38 MAPK 正向序列 5'-CGGTGTGTGCTGCTTTTAT-3', 反向序列 5'-CTGTAGCTTCCTTTTGGCGTG-3'; β -actin 正向序列 5'-TGCTATGTTGCCCTAGACTTCG-3', 反向序列 5'-GTTGGCATAGGTCTTTACGG-3'。RT-qPCR 反应体系共 20 μ L, 反应条件为 95 ℃ 预变性 5 min, 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火 10 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 循环 45 次。熔解曲线反应条件为 95 ℃ 5 s, 65 ℃ 1 min, 冷却。实验结果以 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法表示。

2.6 Western blot 检测 p38 MAPK 蛋白表达 取冻存大鼠滑膜组织块并剪碎, 加入 10 倍体积蛋白裂解液, 充分裂解后提取滑膜组织中总蛋白, 采取 BCA 法检测蛋白浓度, 然后加入蛋白上样缓冲液, 水浴锅煮沸加热 3~5 min, 冷却后定量并制备上样液进行 SDS-PAGE 电泳, 转移至 PVDF 膜, 脱脂奶粉液中室温摇床封闭 30 min, 加入一抗 p38 MAPK(1:1 500)、 β -actin(1:3 000), 4 ℃ 孵育过夜, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入二抗(1:3 000) 37 ℃ 孵育 30 min, 显影与曝光, 应用 Image J 软件分析蛋白的灰度值。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理, 数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采取单因素方差分析, LSD 检验方差齐性。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 丹皮酚对佐剂性关节炎大鼠继发性关节肿胀的影响 与对照组比较, 致炎 12 d(给药前)后, 模型组大鼠继发性足肿胀度增加($P < 0.01$); 与模型组比较, 致炎 16 d(给药 4 d)后, 丹皮酚各剂量组和 SB203580 组均可抑制大鼠继发性足肿胀($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其中丹皮酚高剂量组作用更为明显, 见图 1。

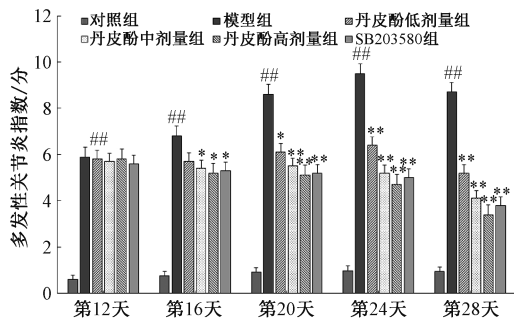


注: 与对照组比较, $^{##} P < 0.01$; 与模型组比较, $^{*} P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$ 。

图 1 丹皮酚对佐剂性关节炎大鼠继发侧关节肿胀的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

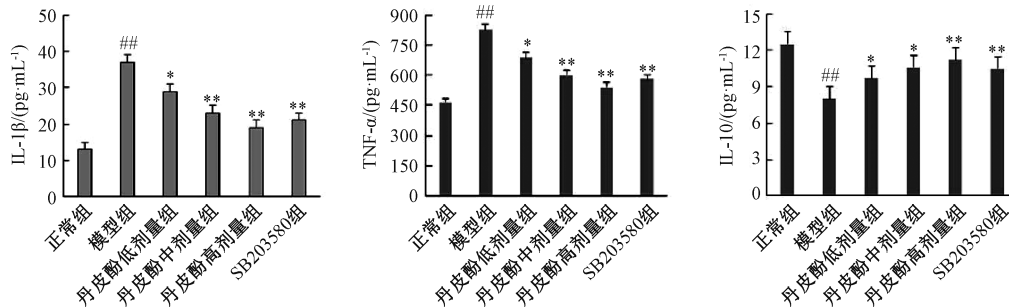
3.2 丹皮酚对佐剂性关节炎大鼠继发性关节炎指数的影响 与对照组比较, 致炎 12 d(给药前)后, 模型组大鼠非致炎侧足趾开始肿胀, 随免疫时间延长而加重, 直至大鼠站立困难, 各时间点关节炎指数评分升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 致炎 16 d(给药 4 d)后, 丹皮酚各剂量组和 SB203580 组均有效改善症状, 关节炎指数评分降低

($P<0.05$, $P<0.01$), 其中丹皮酚高剂量组降低关节炎指数更明显, 见图2。



注: 与对照组比较, $^{##}P<0.01$; 与模型组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

图2 丹皮酚对佐剂性关节炎大鼠多发性关节炎指数的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)



注: 与对照组比较, $^{##}P<0.01$; 与模型组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

图3 丹皮酚对佐剂性关节炎大鼠血清炎症因子含量的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

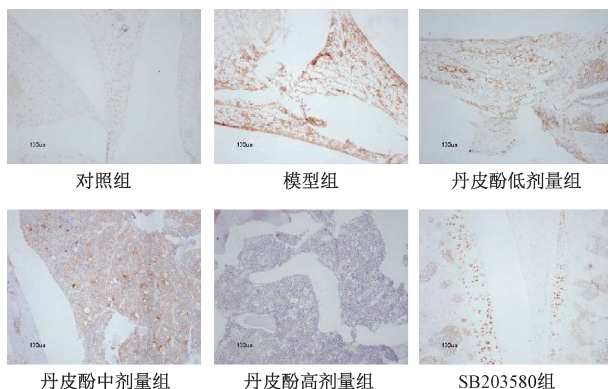


图4 各组大鼠踝关节 p38 MAPK 蛋白免疫组化染色图 ($\times 100$)

表1 丹皮酚对佐剂性关节炎大鼠踝关节 p38 MAPK 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	A 值
对照组	0.17 $\pm$ 0.02
模型组	0.43 $\pm$ 0.08 ^{##}
丹皮酚低剂量组	0.33 $\pm$ 0.06 [*]
丹皮酚中剂量组	0.29 $\pm$ 0.05 [*]
丹皮酚高剂量组	0.23 $\pm$ 0.06 ^{**}
SB203580 组	0.25 $\pm$ 0.05 ^{**}

注: 与对照组比较, $^{##}P<0.01$; 与模型组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

3.3 丹皮酚对佐剂性关节炎大鼠血清炎症因子水平的影响 与对照组比较, 模型组血清中炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 水平升高 ($P<0.01$), IL-10 水平降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 丹皮酚各剂量组和 SB203580 组 IL-1 β 、TNF- α 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), IL-10 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), 见图3。

3.4 丹皮酚对佐剂性关节炎大鼠踝关节 p38 MAPK 蛋白表达的影响 对照组有少量 p38 MAPK 蛋白阳性表达; 与对照组比较, 模型组大鼠关节滑膜组织增厚, p38 MAPK 蛋白阳性表达增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, 丹皮酚各剂量组和 SB203580 组大鼠关节滑膜组织 p38 MAPK 蛋白阳性表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 且随着丹皮酚剂量的增加, p38 MAPK 蛋白阳性表达下降, 见图4、表1。

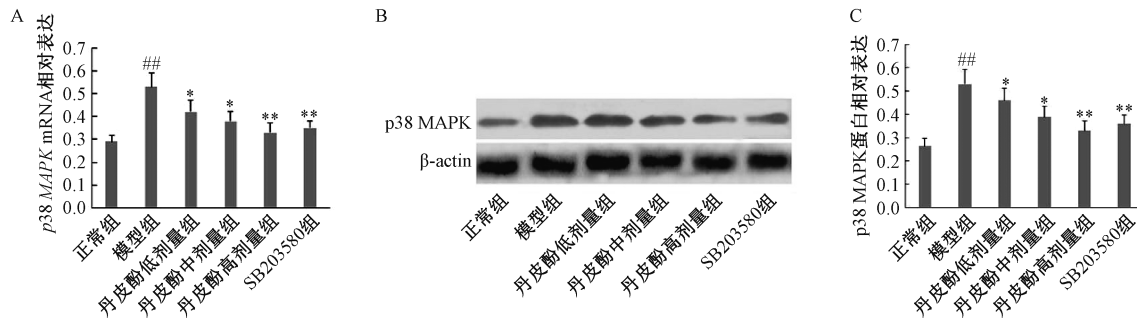
3.5 丹皮酚对佐剂性关节炎大鼠关节滑膜组织 p38 MAPK mRNA 和蛋白表达的影响 与对照组比较, 模型组大鼠关

节滑膜组织 p38 MAPK mRNA 和蛋白表达均升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 丹皮酚各剂量组和 SB203580 组大鼠关节滑膜组织 p38 MAPK mRNA 和蛋白表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 见图5。

4 讨论

中药制剂在药理中常具有多靶点、高安全性等优点, 雷公藤多苷片^[11]、青藤碱^[12]、丹皮酚等抗炎、镇痛作用显著, 常用于类风湿关节炎的治疗。丹皮酚是中药丹皮的提取物, 具有凉血清火、活血化瘀作用, 文献报道其有镇痛、抗炎、清除自由基、抗氧化、抗过敏、解热、抗肿瘤等多种功效^[13]。本研究采取 FCA 局部注射大鼠足趾皮下构建佐剂性关节炎模型, 是一种常见的类风湿关节炎动物模型, 通过探究丹皮酚对佐剂性关节炎的影响, 为丹皮酚在临床上用于治疗类风湿关节炎提供依据。研究表明, 与模型组比较, 第16、20、24、28天时, 丹皮酚各剂量组大鼠继发性足肿胀程度和多发性关节炎指数评分呈剂量依赖性降低, 表明丹皮酚可有效抑制佐剂性关节炎模型大鼠继发性炎症, 降低关节肿胀症状, 且呈剂量依赖性。

在类风湿关节炎发病过程中, 患者体内免疫系统活化, 激活单核-吞噬细胞系统, 导致血清炎症细胞分泌改变, IL-1 β 和 TNF- α 等致炎因子水平升高, IL-1 β 往往作为炎症的始动因素, 刺激滑膜细胞和关节软骨释放前列腺素



注：A 为 p38 MAPK mRNA 表达统计图，B 为 p38 MAPK 蛋白表达条带图，C 为 p38 MAPK 蛋白表达统计图。与对照组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

图5 丹皮酚对佐剂性关节炎大鼠滑膜组织 p38 MAPK mRNA 及蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

E2 和基质金属蛋白酶等，加重滑膜炎反应，分解骨基质^[14]；同时，在类风湿关节炎的活动进展期，由单核-巨噬系统分泌的 TNF- α 呈高表达，且与疾病的严重程度呈正相关，驱动血液中性粒细胞和淋巴细胞向炎症部位积聚，级联机体炎症反应^[15]。本研究表明，丹皮酚可调节佐剂性关节炎大鼠中细胞因子水平，使得致炎因子 IL-1 β 和 TNF- α 水平降低，抑炎因子 IL-10 水平升高，从而减轻佐剂性关节炎大鼠关节炎症症状，包括减轻足肿胀，降低肿胀度和多发性关节炎指数，延缓佐剂性关节炎的发病进程。

近年来，越来越多实验通过探讨类风湿关节炎的病理机制而寻求中药对其有效的治疗方法^[16]，其中 p38 MAPK 信号通路是炎症改变的经典通路^[17-18]。本研究表明，丹皮酚干预佐剂性关节炎模型大鼠 16 d 后，关节和膜组织炎症反应显著改善，关节表面滑膜组织和关节软骨组织中 p38 MAPK 蛋白表达下降，且在基因和蛋白表达上均表现出类似的结果。同时，本研究发现，p38 MAPK 信号通路阻断剂 SB203580 可以改善佐剂性关节炎模型大鼠的关节炎症症状，表明丹皮酚可能通过抑制 p38 MAPK 信号通路而改善佐剂性关节炎症状。

综上所述，丹皮酚具有抑制 p38 MAPK 信号通路，从而抑制炎症因子分泌，保护关节软骨和骨的作用，且呈剂量依赖性，本研究为丹皮酚治疗类风湿关节炎提供了新的理论基础。

参考文献：

- [1] Greenblatt H K, Kim H A, Bettner L F, et al. Preclinical rheumatoid arthritis and rheumatoid arthritis prevention [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2020, 32(3): 289-296.
- [2] Bao Y, Sun Y W, Ji J, et al. Genkwanin ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats through inhibiting JAK/STAT and NF- κ B signaling pathways [J]. *Phytomedicine*, 2019, 63: 153036.
- [3] Zou Q F, Li L, Han Q R, et al. Abatacept alleviates rheumatoid arthritis development by inhibiting migration of fibroblast-like synoviocytes via MAPK pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(7): 3105-3111.
- [4] Rajitha P, Biswas R, Sabitha M, et al. Methotrexate in the treatment of psoriasis and rheumatoid arthritis: mechanistic insights, current issues and novel delivery approaches [J]. *Curr*

- Pharm Des*, 2017, 23(24): 3550-3566.
- [5] Dudics S, Langan D, Meka R R, et al. Natural products for the treatment of autoimmune arthritis: their mechanisms of action, targeted delivery, and interplay with the host microbiome [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9): 2508.
- [6] Wang W J, Wang X C, Tang X P, et al. Classifying rheumatoid arthritis by traditional Chinese medicine Zheng: a multi-center cross-sectional study [J]. *J Tradit Chin Med*, 2019, 39(3): 425-432.
- [7] 陈刚, 殷钟意, 郑旭煦. 丹皮酚改善大鼠痛风性关节炎与调节核因子 κ B 活化的关系研究 [J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(12): 1730-1735.
- [8] Liu N, Feng X, Wang W B, et al. Paeonol protects against TNF- α -induced proliferation and cytokine release of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by upregulating FOXO3 through inhibition of miR-155 expression [J]. *Inflamm Res*, 2017, 66(7): 603-610.
- [9] Santos C R, Benjamin A C A, Chies A B, et al. Adjuvant-induced arthritis affects testes and ventral prostate of Wistar rats [J]. *Andrology*, 2020, 8(2): 473-485.
- [10] Cui X, Wang R J, Bian P M, et al. Evaluation of antiarthritic activity of nimbolide against Freund's adjuvant induced arthritis in rats [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 3391-3398.
- [11] Wang X Y, Zu Y Y, Huang L, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with combination of methotrexate and *Tripterygium wilfordii*: a meta-analysis [J]. *Life Sci*, 2017, 171: 45-50.
- [12] Guo X, Ji J Y, Feng Z T, et al. A network pharmacology approach to explore the potential targets underlying the effect of sinomenine on rheumatoid arthritis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 80: 106201.
- [13] Zhai K F, Duan H, Luo L, et al. Protective effects of paeonol on inflammatory response in IL-1 β -induced human fibroblast-like synoviocytes and rheumatoid arthritis progression via modulating NF- κ B pathway [J]. *Inflammopharmacology*, 2017, 25: 525-532.
- [14] Huang C C, Chiou C H, Liu S C, et al. Melatonin attenuates TNF- α and IL-1 β expression in synovial fibroblasts and diminishes cartilage degradation: implications for the treatment

- of rheumatoid arthritis [J]. *J Pineal Res*, 2019, 66 (3): e12560.
- [15] Pala O, Diaz A, Blomberg B B, et al. B lymphocytes in rheumatoid arthritis and the effects of anti-TNF- α agents on B lymphocytes: a review of the literature[J]. *Clin Ther*, 2018, 40 (6): 1034-1045.
- [16] 郭锦晨, 王 荃, 周 桥, 等. 3种风湿病关节炎处方用药规律的比较[J]. *中成药*, 2021, 43(6): 1583-1588.
- [17] Yang G L, Chang C C, Yang Y W, et al. Resveratrol alleviates rheumatoid arthritis via reducing ROS and inflammation, inhibiting MAPK signaling pathways, and suppressing angiogenesis [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66 (49): 12953-12960.
- [18] 张 青, 徐 月, 彭 伟, 等. 分子对接结合网络药理学研究桂枝芍药知母汤治疗类风湿关节炎的分子作用机制[J]. *中草药*, 2020, 51(18): 4673-4684.

短管兔耳草提取物对对乙酰氨基酚诱导小鼠药物性肝损伤的保护作用与机制

毛 竹, 朱继孝, 曾金祥*, 吴茜娃, 任玲玲

(江西中医药大学中药资源与民族药研究中心, 江西南昌 330004)

摘要:目的 以对乙酰氨基酚(APAP)诱导小鼠药物性肝损伤模型,研究短管兔耳草提取物通过Toll样受体4/核转录因子- κ B(TLR4/NF- κ B)信号通路对药物性肝损伤的保护作用及机制。方法 60只昆明种小鼠随机分为正常组、模型组、阳性药物组(200 mg/kg 乙酰半胱氨酸)及短管兔耳草提取物低、中、高剂量组(1、2、4 g/kg),每组10只。各给药组给予相应剂量药物,正常组和模型组给予等量0.5%羧甲基纤维素钠,连续给药7 d。末次给药1 h后,除正常组外,其余各组小鼠腹腔注射250 mg/kg APAP建立急性肝损伤模型,4 h后采集血样。试剂盒检测血清中天门冬氨酸氨基转移酶(ALT)、丙氨酸氨基转移酶(AST)活性及肝组织中丙二醛(MDA)水平、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和超氧化物歧化酶(SOD)活性,酶联免疫吸附法(ELISA)检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平,苏木素-伊红(HE)染色观察肝组织病理变化,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝组织TLR4、NF- κ B p65蛋白表达。结果 与模型组比较,短管兔耳草提取物高剂量组能降低血清中ALT、AST活性,TNF- α 、IL-1 β 水平,升高肝组织中MDA水平和GSH-Px、SOD活性,下调NF- κ B p65、TLR4蛋白表达,改善肝组织病理学形态。结论 短管兔耳草提取物对APAP致小鼠药物性肝损伤具有一定的保护作用,其机制可能与TLR4/NF- κ B信号通路有关。

关键词:短管兔耳草;对乙酰氨基酚;药物性肝损伤;TLR4/NF- κ B;肝保护

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)09-3004-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.09.048

药物性肝损伤是指药物本身或/和其活性代谢产物所致的肝损伤,其与10%急性肝炎、50%以上急性肝衰竭、4%住院性黄疸有关^[1]。近年来,我国药物性肝损伤的发病率已超过西方发达国家,成为严重威胁人们身体健康不可忽视的公共卫生问题^[2]。N-乙酰半胱氨酸(NAC)、异甘草酸镁、糖皮质激素、水飞蓟素、甘草酸和S-腺苷基甲硫氨酸常用于治疗急性药物性肝损伤^[3-5],但NAC治疗窗口窄且具有严重的胃肠道毒副作用^[3-4],而其它药物是否可成功防治药物性肝损伤仍然存在疑问^[5]。

中草药及其成分对药物性肝损伤具有良好的疗效^[6-9],为筛选抗药物性肝损伤药物提供了重要途径^[10]。藏药短管

兔耳草系玄参科兔耳草属植物 *Lagotisbrevituba* Maxim. 的干燥全草,为藏药“洪连”的基原植物之一,具有清热解暑、行血调经之功效^[11]。现代药理学研究表明短管兔耳草具有降尿酸、抗痛风、改善阿尔茨海默病症、调节小鼠免疫功能、抗肿瘤等多种活性^[11-15]。本课题组前期研究发现短管兔耳草可通过清除自由基、抑制脂质过氧化反应、调控炎症因子等途径,有效防治急性酒精性肝损伤、 α -异硫氰酸萘酯致肝损伤、四氯化碳致肝损伤^[16-18]。最新研究表明,TLR4/NF- κ B信号通路对肝损伤疾病的防治具有重要意义^[19-21]。基于此,本研究通过TLR4/NF- κ B通路继续探讨短管兔耳草提取物对对乙酰氨基酚(acetaminophen,

收稿日期: 2020-10-25

基金项目: 江西省自然科学基金项目(20171BAB205090);江西中医药大学民族药协同创新项目(JXXT2018001);江西中医药大学中药双一流学科建设项目(JXSYLXK-ZHYA0033)

作者简介: 毛 竹(1993—),硕士生,从事民族药有效成分与作用机制研究。Tel: (0791) 87119065, E-mail: 969329843@qq.com

*通信作者: 曾金祥(1974—),博士,从事民族药有效成分与作用机制研究。Tel: (0791) 87119065, E-mail: zjinxiang@163.com