

- [11] Wang W L, Sheu S Y, Chen Y S, *et al.* Evaluating the bone tissue regeneration capability of the Chinese herbal decoction Danggui Buxue Tang from a molecular biology perspective [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 853234.
- [12] Moon Y J, Yun C Y, Choi H, *et al.* Smad4 controls bone homeostasis through regulation of osteoblast/osteocyte viability [J]. *Exp Mol Med*, 2016, 48(9): e256.
- [13] Aboushady I M, Salem Z A, Sabry D, *et al.* Comparative study of the osteogenic potential of mesenchymal stem cells derived from different sources [J]. *J Clin Exp Dent*, 2018, 10(1): e7-e13.
- [14] Kim D, Ko Y, Park M, *et al.* Regulation of osteosclerosis by inoculated Cd133<sup>+</sup> PC3 cells in bone-marrow microenvironmental niches [J]. *JBMR Plus*, 2019, 3(7): e10189.
- [15] Lee S S, Sharma A R, Choi B S, *et al.* The effect of TNF $\alpha$  secreted from macrophages activated by titanium particles on osteogenic activity regulated by WNT/BMP signaling in osteoprogenitor cells [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(17): 4251-4263.
- [16] Liu K, Meng C X, Lv Z Y, *et al.* Enhancement of BMP-2 and VEGF carried by mineralized collagen for mandibular bone regeneration [J]. *Regen Biomater*, 2020, 7(4): 435-440.
- [17] Pulkkinen H H, Kiema M, Lappalainen J P, *et al.* BMP6/TAZ-Hippo signaling modulates angiogenesis and endothelial cell response to VEGF [J]. *Angiogenesis*, 2021, 24(1): 129-144.
- [18] Park H, No A L, Lee J M, *et al.* PDE4 inhibitor upregulates PTH-induced osteoclast formation *via* CRE-mediated COX-2 expression in osteoblasts [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(1): 173-180.
- [19] Chen G, Deng C, Li Y P. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation [J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(2): 272-288.
- [20] Zhang Y, Sun Y, Liu J, *et al.* MicroRNA-346-5p regulates differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inhibiting transmembrane protein 9 [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 8822232.

## 藤黄酸对肾透明细胞癌凋亡及铁死亡的影响

谢若鑫, 邱剑光\*, 王德娟, 袁昊  
(中山大学附属第六医院, 广东广州 510655)

**摘要:** 目的 探讨藤黄酸对肾透明细胞癌凋亡及铁死亡的影响。方法 使用不同浓度藤黄酸干预 786-O 及 ACHN 细胞 24 h, CCK-8 法检测细胞活力以筛选合适的作用浓度。流式细胞术检测细胞活性氧 (ROS) 和线粒体活性氧 (mitoROS) 水平, 铁离子比色法检测试剂盒检测游离铁水平变化, Western blot 法检测凋亡蛋白 (Bcl-2、Bax) 和铁死亡蛋白 (FTH1、GPX4) 表达。结果 藤黄酸能够抑制 786-O、ACHN 细胞活力, 并浓度依赖性地升高细胞凋亡率和 ROS、mitoROS、游离铁水平 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。添加铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 (Fer-1) 后可在一定程度上恢复藤黄酸诱导的 ROS、mitoROS、游离铁水平变化 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。藤黄酸干预后, 786-O、ACHN 细胞的铁死亡标志蛋白 FTH1 和 GPX4 表达均降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 且 Fer-1 部分恢复了 FTH1 和 GPX4 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论 藤黄酸可能通过下调 Bcl-2/Bax 比值诱导肾透明细胞癌凋亡, 并通过抑制 FTH1 和 GPX4 蛋白表达诱导铁死亡。

**关键词:** 藤黄酸; 肾透明细胞癌; 凋亡; 铁死亡

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2023)06-2011-06

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.06.045

在全球范围内, 肾细胞癌 (renal cell carcinoma, RCC) 是第九大最常见的癌症, 其中肾透明细胞癌, 即透明细胞肾细胞癌 (clear cell renal cell carcinoma, ccRCC) 是肾细胞癌最常见的病理亚型, 占有肾细胞癌病例近 80%<sup>[1-2]</sup>。ccRCC 需要借由高活性脂质和糖原合成、沉积维持其独特的透明形态<sup>[3]</sup>, 这与铁死亡 (一种通过细胞内活性氧和脂

质过氧化物累积的铁依赖性细胞程序性死亡方式) 存在一定联系<sup>[4-5]</sup>。藤黄酸是一种由藤黄提取纯化, 具有多种生物活性的天然成分, 有抗炎、抗氧化、抗菌等作用<sup>[6]</sup>。近年来, 藤黄酸已被证实具有多种抗癌活性, 如促进癌细胞凋亡、自噬, 抑制增殖、转移和血管活性<sup>[7-8]</sup>。目前关于藤黄酸的 II b 期临床试验正在进行, 其中就包括肾癌<sup>[9]</sup>。在癌

收稿日期: 2022-12-19

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (Z20190107202209744)

作者简介: 谢若鑫 (1996—), 男, 硕士生, 研究方向为泌尿系统肿瘤及中药药理。E-mail: xieruoxinceo@163.com

\* 通信作者: 邱剑光 (1972—), 男, 主任医师, 研究方向为泌尿系统肿瘤。E-mail: qiujiug@mail.sysu.edu.cn

细胞代谢方面, 藤黄酸被证实能够提高活性氧 (ROS) 水平, 进而诱导癌细胞发生凋亡、自噬<sup>[10]</sup>, 而 ROS 水平的提高在诱导铁死亡的关键环节——脂质过氧化方面发挥关键作用<sup>[11]</sup>。本研究探索了藤黄酸对肾透明细胞癌 786-O 和 ACHN 细胞凋亡和铁死亡的影响, 以期为藤黄酸应用于肾透明细胞癌治疗奠定实验基础。

## 1 材料

1.1 细胞 肾透明细胞癌 786-O 和 ACHN 由周玖瑶教授 (广州中医药大学) 友情提供。

1.2 试剂与药物 藤黄酸 (纯度  $\geq 97\%$ , 货号 G101480) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 (Fer-1, 纯度 99.59%, 货号 HY-100579) 由美国 MedChemExpress 公司赠送; RPMI-1640 培养基、MEM 培养基、胎牛血清 (货号 C11875500BT、C11095500BT、16000044) 均购自美国 Gibco 公司; FTH1、GPX4、GAPDH、Bax、Bcl-2 抗体 (货号 ab89787、ab125066、ab181602、ab32503、ab194583) 均购自艾博抗 (上海) 贸易有限公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒 (货号 70-AP101-100) 购自杭州联科生物技术股份有限公司; 铁离子比色法检测试剂盒 (货号 E1042-300) 购自北京普利莱基因技术有限公司; 活性氧检测试剂盒 (货号 S0033M) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 线粒体超氧化物染色试剂盒 (MitoSOX-red, 货号 M36008) 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司。

## 2 方法

2.1 细胞培养 786-O 细胞使用 RPMI-1640 培养基, ACHN 细胞使用 MEM 培养基, 培养基均含 10% 胎牛血清和 2% 双抗, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养, 并取对数生长期细胞用于实验。

2.2 细胞活力测定 将细胞以每孔  $4 \times 10^4$  个的密度接种到 96 孔板中, 孵育过夜, 以 0 (对照组)、8、4、2、1.5、1、0.5、0.25  $\mu\text{mol/L}$  藤黄酸分别干预细胞 24 h, 弃上清液, 每孔加入含 10% CCK-8 的培养基 150  $\mu\text{L}$ , 继续孵育 1.5 h, 使用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度, 并以对照组平均值为基准计算各组相对细胞活力。

2.3 细胞分组及给药 取对数生长期的肾透明细胞癌细胞以每孔  $2 \times 10^5$  个的密度接种于 6 孔板, 分为对照组, 藤黄酸低、中、高剂量组 (786-O 细胞为 0.4、0.8、1.2  $\mu\text{mol/L}$ , ACHN 细胞为 1.0、1.5、2.0  $\mu\text{mol/L}$ ), 藤黄酸联合 Fer-1 组 (786-O 细胞为 0.8  $\mu\text{mol/L}$  藤黄酸+1.0  $\mu\text{mol/L}$  Fer-1, ACHN 细胞为 1.5  $\mu\text{mol/L}$  藤黄酸+1.0  $\mu\text{mol/L}$  Fer-1) 和 Fer-1 组 (1.0  $\mu\text{mol/L}$ )。待细胞贴壁后开始给药干预, 各组同时干预 24 h。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡情况 细胞按“2.3”项下方法分组及给药, 干预结束后弃培养基, PBS 润洗 2 次, 加入 Annexin V-FITC/PI (1:2) 染液避光孵育 15 min, 收集细胞, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.5 ROS 水平检测 细胞按“2.3”项下方法分组及给

药, 干预结束后弃培养基, 在暗环境中用含 10  $\mu\text{mol/L}$  DCFH-DA 的无血清培养基 37 °C 孵育 30 min, 弃上清液, PBS 润洗 3 次, 收集细胞, 使用流式细胞仪通过 FITC 通道检测 DCF 平均荧光强度, 实验重复 3 次。

2.6 mitoROS 水平检测 细胞按“2.3”项下方法分组及给药, 干预结束后弃培养液, 在暗环境中用含 5  $\mu\text{mol/L}$  MitoSOX 的无血清培养基 37 °C 孵育 20 min, 弃上清液, PBS 润洗 3 次, 收集细胞, 使用流式细胞仪通过 PE 通道检测 MitoSOX 平均荧光强度, 实验重复 3 次。

2.7 游离铁水平检测 细胞按“2.3”项下方法分组及给药, 干预结束后使用预冷 PBS 洗涤 2 次, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  裂解液裂解细胞, 剧烈振荡 30 s, 置于摇床裂解 2 h, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清与配制好的工作液在 60 °C 下反应 1 h, 加入 30  $\mu\text{L}$  铁离子检测剂室温孵育 30 min, 在 570 nm 波长处测定吸光度, 并以对照组均值为基准计算各组相对游离铁水平。

2.8 Western blot 法检测 Bcl-2、Bax、FTH1、GPX4 蛋白表达 细胞按“2.3”项下方法分组及给药, 干预结束后, 弃培养液, PBS 润洗细胞, 每孔加 100  $\mu\text{L}$  1×RIPA 裂解液, 置于冰上裂解 20 min, 收集细胞, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液即得总蛋白。用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 蛋白加入 5×Loading buffer 后混匀, 100 °C 加热 5 min 进行变性。蛋白样本经电泳、转膜后, 用 10% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加入一抗 4 °C 孵育过夜, 次日弃一抗, 加入二抗室温孵育 1 h, 用 ECL 发光液显影、曝光, Image J 软件分析条带灰度值, 计算目的蛋白相对表达。

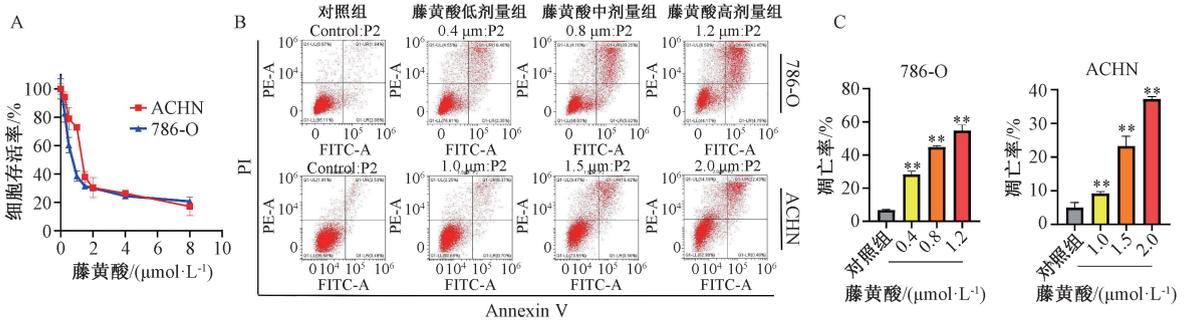
2.9 统计学分析 通过 GraphPad Prism 9.0.0 软件进行处理, 数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 3 结果

3.1 藤黄酸对肾透明细胞癌细胞活力及凋亡的影响 与对照组比较, 786-O 和 ACHN 细胞经不同浓度藤黄酸干预 24 h 后, 细胞活力呈浓度依赖性降低, IC<sub>50</sub> 值分别为 0.82、1.42  $\mu\text{mol/L}$ , 见图 1A。如图 1B~1C 所示, 与对照组比较, 藤黄酸可诱导肾透明细胞癌细胞凋亡, 且凋亡率呈浓度依赖性升高 (P < 0.01)。

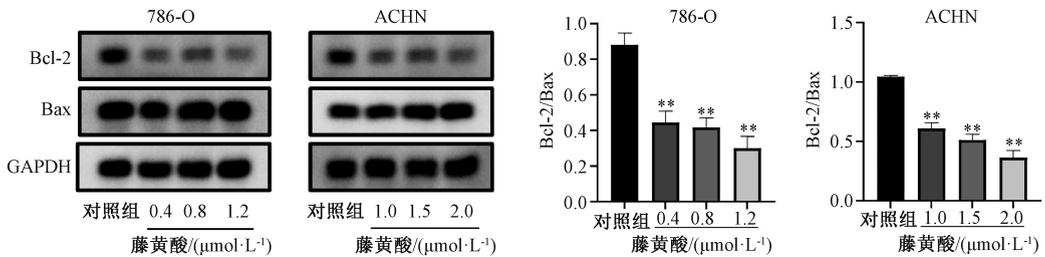
3.2 藤黄酸对肾透明细胞癌细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2/Bax 比值的影响 Bax 和 Bcl-2 在细胞凋亡进程中发挥重要作用, Bcl-2/Bax 比值降低提示细胞发生凋亡。如图 2 所示, 与对照组比较, 藤黄酸浓度依赖性地降低 786-O 和 ACHN 细胞 Bcl-2/Bax 比值 (P < 0.01)。

3.3 藤黄酸对肾透明细胞癌细胞 ROS、mitoROS 和游离铁的影响 ROS、mitoROS 和游离铁的增加是铁死亡的特征。如图 3 所示, 与对照组比较, 藤黄酸浓度依赖性地增加 786-O 和 ACHN 细胞 DCF 荧光强度 (ROS 水平) (P < 0.05, P < 0.01)。分别使用 0.8、1.5  $\mu\text{mol/L}$  藤黄酸处理 786-O 和 ACHN 细胞后, MitoSOX 荧光强度 (mitoROS 水平) 和游离



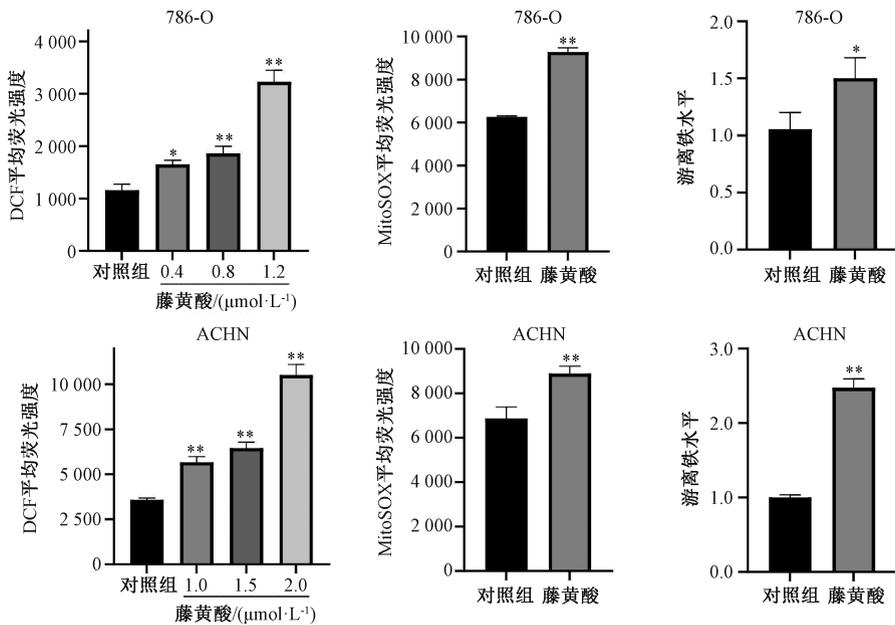
注：与对照组比较，\*\*  $P < 0.01$ 。

图1 藤黄酸对786-O和ACHN细胞存活率及凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



注：与对照组比较，\*\*  $P < 0.01$ 。

图2 藤黄酸对786-O和ACHN细胞Bcl-2和Bax蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



注：与对照组比较，\*  $P < 0.05$ ，\*\*  $P < 0.01$ 。

图3 藤黄酸对786-O和ACHN细胞ROS、mitoROS、游离铁水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

铁水平平均增加 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

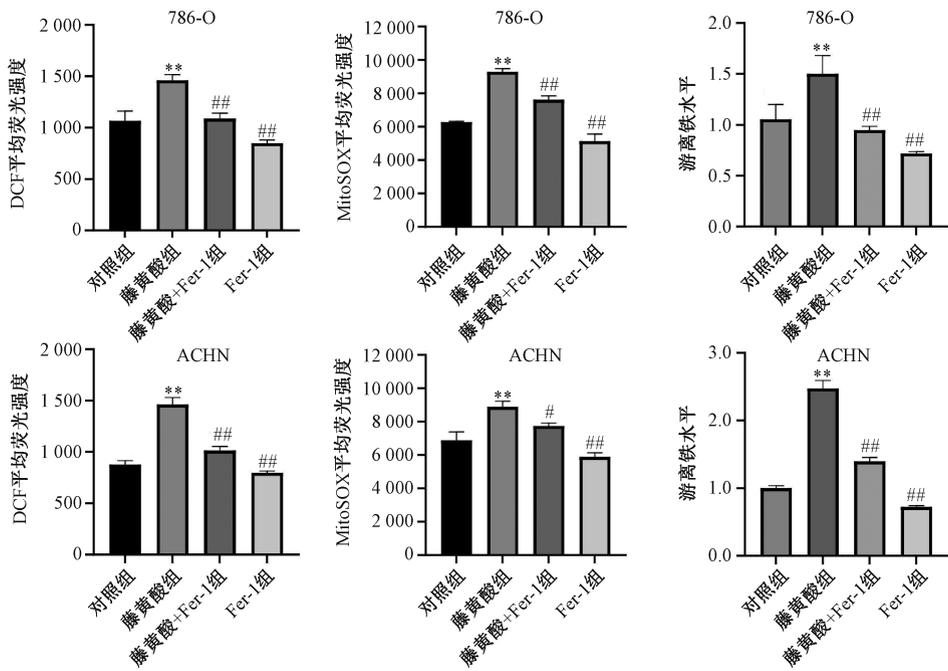
3.4 Fer-1逆转藤黄酸对肾透明细胞癌细胞的作用 铁死亡抑制剂 Fer-1 可通过还原机制拯救脂质 ROS 引起的膜脂损伤进而抑制铁死亡。如图 4 所示，Fer-1 可在一定程度上逆转藤黄酸对 786-O 和 ACHN 细胞 ROS、mitoROS、游离铁水平的作用 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

3.5 藤黄酸通过下调 FTH1 和 GPX4 表达诱导铁死亡 铁死亡标志蛋白 FTH1 和 GPX4 是反映细胞发生铁死亡的经典

标志物。藤黄酸浓度依赖性地降低 786-O 和 ACHN 细胞 FTH1、GPX4 蛋白表达 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )，见图 5；而添加 Fer-1 后，均可在不同程度上恢复 786-O 和 ACHN 细胞 FTH1、GPX4 蛋白表达 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )，见图 6。以上结果表明，藤黄酸可以通过降低 FTH1 和 GPX4 蛋白表达诱导肾透明细胞癌铁死亡。

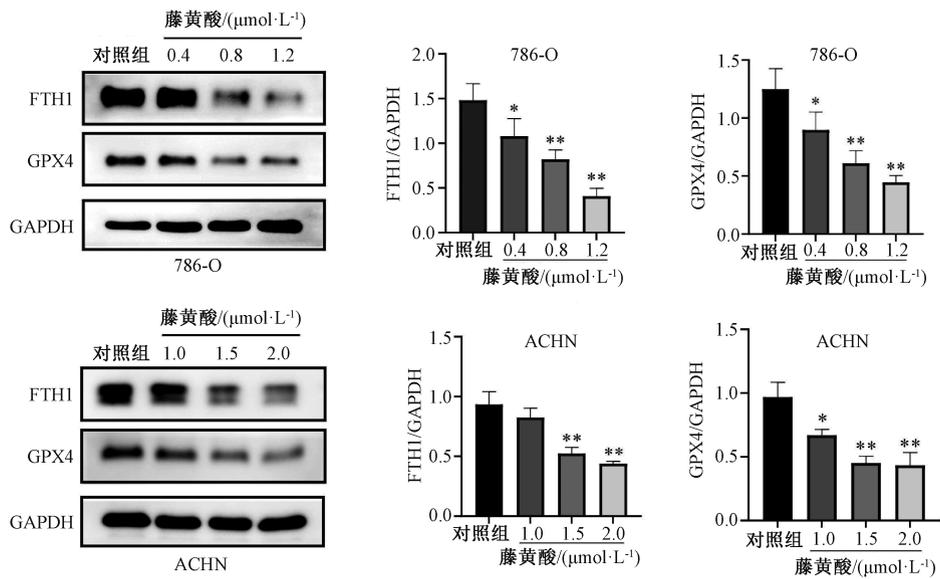
#### 4 讨论

铁死亡特征是铁依赖性的脂质过氧化积累，最近被认



注：与对照组比较，\*\*  $P < 0.01$ ；藤黄酸组比较，#  $P < 0.05$ ，##  $P < 0.01$ 。

图4 Fer-1逆转藤黄酸对786-O和ACHN细胞ROS、mitoROS及游离铁水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

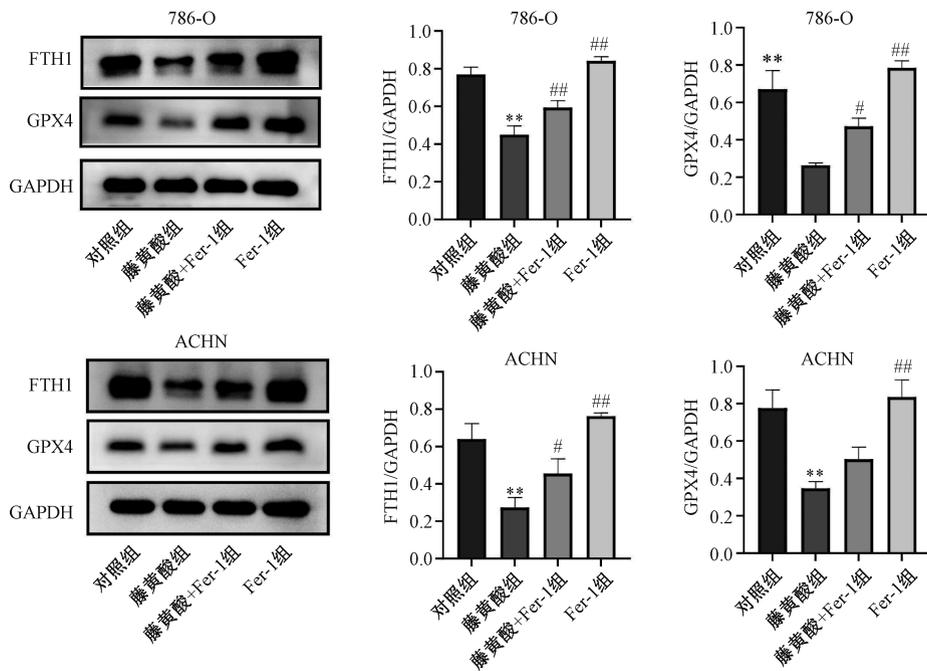


注：与对照组比较，\*  $P < 0.05$ ，\*\*  $P < 0.01$ 。

图5 藤黄酸对786-O和ACHN细胞FTH1和GPX4蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

为是癌症治疗中的一种肿瘤抑制机制，特别是在根除对常规疗法有抵抗力的肿瘤方面<sup>[12-13]</sup>。FTH1和GPX4是铁死亡的关键调节因子。研究表明，肾透明细胞癌对GPX4抑制具有显著敏感性，这与其独特的高活性脂质及高糖原储存等代谢特征有关<sup>[14]</sup>。血清铁蛋白是肾透明细胞癌的有效标志物<sup>[15]</sup>，FTH1作为编码铁蛋白重链的基因，其表达增加有助于细胞的铁蛋白及铁的积累<sup>[16]</sup>。FTH1已被证实肾透明细胞癌的诊断和预后中具有一定价值<sup>[17]</sup>，这提示通过调节FTH1诱导铁死亡在ccRCC的针对性治疗方面可能具有很大潜力。

藤黄酸作为从天然草本植物藤黄提取出来的纯化单体，其抗肿瘤作用在近几年得到广泛研究<sup>[6]</sup>。藤黄酸已被证实能在一定程度上提高吉西他滨、多西紫杉醇等化疗药物的抗肿瘤作用<sup>[18-19]</sup>，并且因其具有的抗肿瘤作用前景，还被广泛应用于纳米药物递送系统的组合中，以得到更高效的抗肿瘤作用和更低的毒副作用<sup>[20]</sup>。藤黄酸已被证实能够抑制肾透明细胞癌，其部分作用机制也已被探究<sup>[21-22]</sup>。本研究显示，藤黄酸能够抑制肾透明细胞癌786-O和ACHN细胞的活力，诱导细胞凋亡和铁死亡，且这些作用在一定程度上受到铁死亡抑制剂Fer-1的抑制。



注：与对照组比较，\*\* $P < 0.01$ ；藤黄酸组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图6 藤黄酸联合 Fer-1 对 786-O 和 ACHN 细胞 FTH1 和 GPX4 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

综上所述，藤黄酸能诱导肾透明细胞癌细胞凋亡及铁死亡，其中诱导凋亡的作用机制可能是通过下调 Bcl-2/Bax 比值，而诱导铁死亡的作用机制可能是通过抑制 FTH1 和 GPX4 的表达。本研究阐明了藤黄酸可能通过凋亡和铁死亡两条途径促进肾透明细胞癌细胞的死亡，为藤黄酸应用于肾透明细胞癌铁死亡治疗提供了实验依据。

参考文献：

[ 1 ] Rini B I, Campbell S C, Escudier B. Renal cell carcinoma[J]. *Lancet*, 2009, 373(9669): 1119-1132.

[ 2 ] Jonasch E, Gao J, Rathmell W K. Renal cell carcinoma[J]. *Brit Med J*, 2014, 349: 4797.

[ 3 ] Wettersten H I, Aboud O A, Lara P N Jr, et al. Metabolic reprogramming in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2017, 13(7): 410-419.

[ 4 ] Yang W S, Stockwell B R. Ferroptosis: Death by lipid peroxidation[J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(3): 165-176.

[ 5 ] Dixon S J, Lemberg K M, Lamprecht M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.

[ 6 ] Liu Y L, Chen Y C, Lin L F, et al. Gambogic acid as a candidate for cancer therapy: A review[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 10385-10399.

[ 7 ] Kashyap D, Mondal R, Tuli H S, et al. Molecular targets of gambogic acid in cancer: recent trends and advancements[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(10): 12915-12925.

[ 8 ] Wan L, Zhang Q, Wang S, et al. Gambogic acid impairs tumor angiogenesis by targeting YAP/STAT3 signaling axis [J]. *Phytother Res*, 2019, 33(5): 1579-1591.

[ 9 ] Chi Y, Zhan X K, Yu H, et al. An open-labeled, randomized, multicenter phase IIa study of gambogic acid injection for advanced malignant tumors [J]. *Chin Med J ( Engl )*, 2013, 126(9): 1642-1646.

[ 10 ] Wang H C, Zhao Z, Lei S Z, et al. Gambogic acid induces autophagy and combines synergistically with chloroquine to suppress pancreatic cancer by increasing the accumulation of reactive oxygen species[J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 7.

[ 11 ] Chen X, Li J B, Kang R, et al. Ferroptosis: machinery and regulation[J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2054-2081.

[ 12 ] Bersuker K, Hendricks J M, Li Z, et al. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis [J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 688-692.

[ 13 ] Liang C, Zhang X, Yang M, et al. Recent progress in ferroptosis inducers for cancer therapy[J]. *Adv Mater*, 2019, 31(51): e1904197.

[ 14 ] Zou Y, Palte M J, Deik A A, et al. A GPX4-dependent cancer cell state underlies the clear-cell morphology and confers sensitivity to ferroptosis [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1617.

[ 15 ] Miyata Y, Koga S, Nishikido M, et al. Relationship between serum ferritin levels and tumour status in patients with renal cell carcinoma[J]. *BJU Int*, 2001, 88(9): 974-977.

[ 16 ] MacKenzie E L, Iwasaki K, Tsuji Y. Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10(6): 997-1030.

[ 17 ] Huang H, Qiu Y, Huang G, et al. Value of ferritin heavy chain (FTH1) expression in diagnosis and prognosis of renal cell carcinoma[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 3700-3715.

[ 18 ] Zou Z Y, Wei J, Li X L, et al. Enhancement of anticancer

- efficacy of chemotherapeutics by gambogic acid against gastric cancer cells[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2012, 27(5): 299-306.
- [19] Hatami E, Nagesh P K B, Jaggi M, et al. Gambogic acid potentiates gemcitabine induced anticancer activity in non-small cell lung cancer[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 888: 173486.
- [20] Hatami E, Jaggi M, Chauhan S C, et al. Gambogic acid: A shining natural compound to nanomedicine for cancer therapeutics[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1874(1): 188381.
- [21] Jang J H, Kim J Y, Sung E G, et al. Gambogic acid induces apoptosis and sensitizes TRAIL-mediated apoptosis through downregulation of cFLIPL in renal carcinoma Caki cells[J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(1): 376-384.
- [22] Jiang X L, Zhang Y, Luo C L, et al. Targeting renal cell carcinoma with gambogic acid in combination with sunitinib *in vitro* and *in vivo*[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(12): 6463-6468.

## 兖州卷柏水提物对急性酒精性肝损伤小鼠保肝及肠道菌群的影响

温扬敏<sup>1</sup>, 田力<sup>1</sup>, 蔡炼<sup>2</sup>, 邱丹夔<sup>1</sup>

(1. 泉州医学高等专科学校基础医学部, 福建泉州 362000; 2. 泉州市医药研究所, 福建泉州 362000)

**摘要:** 目的 研究兖州卷柏水提物对急性酒精性肝损伤小鼠保肝及肠道菌群的影响。方法 将60只小鼠随机分成6组, 每组10只。正常组和模型组每天灌胃生理盐水, 阳性组每天灌胃100 mg/kg 葵花护肝片, 兖州卷柏低、中、高剂量组每天分别灌胃100、150、200 mg/kg 兖州卷柏水提物, 连续15 d。末次给药3 h后, 模型组、阳性组和兖州卷柏各剂量组小鼠灌胃10 mL/kg 无水乙醇, 正常组小鼠灌胃等体积生理盐水。造模24 h后, 检测血清谷草转氨酶(GOT)、谷丙转氨酶(GPT)和碱性磷酸酶活性(ALP)活性, 以及肝组织核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )蛋白表达, HE染色观察肝组织病理性改变, 采用高通量测序技术对小鼠粪便细菌进行分析。结果 与模型组比较, 兖州卷柏各剂量组小鼠血清GOT、GPT和ALP活性降低( $P < 0.05$ ), 肝组织TNF- $\alpha$ 和NF- $\kappa$ B表达降低( $P < 0.05$ ), 肝组织病理性损伤得到改善, 酒精引起的肠道菌群紊乱得到一定恢复。结论 兖州卷柏对酒精引起小鼠肝损伤具有一定保护作用, 其机制可能与阻断NF- $\kappa$ B通路的活化进而抑制炎症反应, 以及改善肠道菌群紊乱有关。

**关键词:** 兖州卷柏; 水提物; 急性酒精性肝损伤; 肠道细菌; 炎症反应; 保肝作用

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2023)06-2016-07

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.06.046

据世界卫生组织发布的《2018全球酒精与健康报告》显示, 我国约有6%的男性和1%的女性居民死于酒精相关疾病, 酒精性肝病对人类健康造成严重危害<sup>[1]</sup>。近年来研究发现, 肠道微生物在酒精性肝病的发生发展中发挥着重要作用<sup>[2]</sup>。过量饮酒引起由肠黏膜屏障、肠道微生物及肝组成的“肠-肝轴”失调, 导致肠道细菌移位, 细菌及其代谢产物通过与肝脏库普弗巨噬细胞(kupffer cell)的Toll样受体4(toll-like receptor 4, TLR-4)结合, 调控核因子 $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)炎症信号通路引发炎症, 加速肝损伤<sup>[3]</sup>。以肠道菌群为靶点是未来治疗酒精性肝病的一个重要手段。

兖州卷柏为卷柏科植物兖州卷柏*Selaginella involvens* 全草, 具有清热利湿、止咳、解毒等功效。兖州卷柏在民间广泛用于治疗肝炎, 并取得良好的效果<sup>[4]</sup>。课题组前期研

究表明, 兖州卷柏水提物能减轻CCl<sub>4</sub>引起的肝组织损伤, 但其保肝的有效物质及作用机制还不清楚<sup>[5]</sup>。肠道菌群是中药起效过程的关键点, 基于肠道菌群的中药活性成分及效应物质发现模式具有重要意义<sup>[6]</sup>。本研究通过探讨兖州卷柏对急性酒精性肝损伤小鼠的保肝作用及肠道菌群的影响, 以期对兖州卷柏应用于酒精性肝病的临床治疗提供依据。

### 1 材料

1.1 动物 60只SPF昆明小鼠, 体质量19~21 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 实验动物生产许可证号SCXK(京)2020-0004。小鼠饲养环境为温度(25±2)℃, 12 h/12 明暗交替, 自由饮水, 适应性饲养1周后开始实验。

1.2 试剂与药物 兖州卷柏采集自福建宁化县治平乡泥坑

收稿日期: 2021-12-20

基金项目: 泉州市科技计划项目(2015Z92)

作者简介: 温扬敏(1979—), 男, 博士, 副教授, 从事细胞与遗传学研究。Tel: (0595) 22136661, E-mail: ymwen4979@126.com