

· 制剂与炮制 ·

基于 Nrf2/HO-1 通路探讨炮制降低雷公藤心毒性的作用机制

宋玲玲¹, 王君明^{1,2*}, 关月晨¹, 王彦媚¹, 弓明珠¹, 李炳印¹

(1. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046; 2. 河南中医药大学呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南 郑州 450046)

[摘要] 该研究考察了不同炮制方法对雷公藤诱导的心毒性的减毒作用,并基于核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)/血红素氧合酶 1(HO-1)通路初探炮制减毒机制。雷公藤生品及其各炮制品(清炒品、金钱草炒炙品、绿豆炒炙品、白芍炒炙品、甘草炒炙品、醋炙品)均以 $2\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以生药计)的剂量被灌胃给予小鼠连续 28 d,末次给药后 24 h,通过对小鼠血清生化指标的检测分析评价其减毒作用,通过蛋白免疫印迹法对心组织 Nrf2/HO-1 通路关键蛋白的表达、以及试剂盒法对部分氧化/抗氧化相关指标的检测分析,初探其减毒机制。雷公藤生品给药诱导小鼠血清肌酸激酶、乳酸脱氢酶、心脂质过氧化产物丙二醛的水平均显著升高($P < 0.01$),以及心 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平及总超氧化物歧化酶、还原型谷胱甘肽、谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽 S-转移酶的水平均显著降低($P < 0.01$);而金钱草炒炙品、绿豆炒炙品、白芍炒炙品、甘草炒炙品、醋炙品给药后均在不同程度上逆转了雷公藤诱导的以上指标的异常($P < 0.05, P < 0.01$),其中尤以金钱草炒炙品的逆转率为最高。综上,采用金钱草、绿豆、白芍、甘草分别炒炙,以及醋炙法炮制,均对雷公藤诱导的心毒性有减毒作用,且以金钱草炒炙法的减毒作用更佳,减毒机制可能与上调 Nrf2 所介导的心抗氧化防御并减轻氧化损伤有关。

[关键词] 雷公藤; 炒炙法; 炮制减毒; 心毒性

Preliminary exploration of detoxification mechanism of processing methods on cardiotoxicity induced by radix *Tripterygium wilfordii* in mice via Nrf2/HO-1 pathway

SONG Ling-ling¹, WANG Jun-ming^{1,2*}, GUAN Yue-chen¹, WANG Yan-mei¹, GONG Ming-zhu¹, LI Bing-yin¹

(1. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education Ministry of China, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] This study aims to investigate the detoxification effects of different processing methods on the cardiotoxicity induced by radix *Tripterygium wilfordii*, and preliminarily explore the detoxification mechanism via the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase 1 (HO-1) pathway. The raw and processed products [stir-fried product, product stir-fried with *Lysimachiae Herba* (JQC), product stir-fried with *Phaseoli Radiati Semen* (LD), product stir-fried with *Paeoniae Radix Alba* (BS), product stir-fried with *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* (GC), and product stir-fried with vinegar (CZ)] of radix *T. wilfordii* were administrated to mice by gavage at a dose of $2\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (based on crude drugs) for 28 days. Twenty-four hours after the last administration, we measured the

[收稿日期] 2021-03-30

[基金项目] 河南省高校科技创新人才支持计划项目(16HASTIT032);河南中医药大学仲景高层次人才专项(00104311-2021-1-43);河南中医药大学科技创新人才支持计划项目(2015XCXRC01)

[通信作者] *王君明,教授,博士生导师,主要从事中药药性药效机理、毒效相关性及其安全性评价研究, Tel: (0371)65962746, E-mail: mjw98_2010@163.com

[作者简介] 宋玲玲,硕士研究生, E-mail: s17839974080@163.com

serum biochemical indexes of mice to evaluate the detoxification effect. Furthermore, we determined the expression of key proteins of Nrf2/HO-1 pathway in mouse heart tissue by Western blot and some oxidation/antioxidation-related indexes by corresponding kits to explore the detoxification mechanism. The administration of the raw product elevated the levels of serum creatine kinase, lactate dehydrogenase, and malondialdehyde, a product of cardiac lipid peroxidation ($P < 0.01$), down-regulated the protein levels of Nrf2 and HO-1 ($P < 0.01$), and reduced the levels of total superoxide dismutase, glutathione, glutathione peroxidase, and glutathione S-transferase ($P < 0.01$). However, after the administration of the products stir-fried with JQC, LD, BS, GC, and CZ, the abnormalities of the above indexes induced by the raw product were recovered ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In particular, the product stir-fried with JQC showed the best performance. Taken all together, the cardiotoxicity induced by radix *T. wilfordii* could be attenuated by stir-frying with JQC, LD, BS, GC, and CZ, and the stir-frying with JQC showed the best detoxification effect. The mechanism might be associated with the cardiac antioxidant defense and oxidative damage mitigation mediated by the up-regulated Nrf2.

[Key words] *Tripterygium wilfordii*; stir-frying methods; detoxification by processing; cardiotoxicity

DOI:10.19540/j.cnki.cjmm.20210924.301

中药雷公藤具有祛风除湿、消肿止痛、杀虫解毒^[1]的功效,特别是治疗类风湿性关节炎疗效卓著,然而却能引起肝、肾、心等多器官的毒性反应^[2-3],严重影响了其用药的安全性。关伟等^[4]研究发现,给予大鼠连续灌胃给药雷公藤甲素7周后可致心肌毒性。新近报道了雷公藤可造成心悸、胸闷、心动过缓,甚至心源性休克等相关毒性反应^[5],另有研究进一步指出雷公藤水提物诱导的心脏毒性显著^[6]。近年来,为了降低雷公藤的毒性,有研究通过金钱草^[7]、白芍^[8]、甘草^[9]、米醋^[10]几种辅料炮制或配伍后,探讨雷公藤致肝毒性的减毒作用,同时,课题组前期考察了甘草、金银花、白芍、绿豆煮制炮制后对雷公藤所致肝毒和肾毒的减毒作用^[11-12]。然而关于以上几种辅料炮制后对雷公藤致心毒性的减毒研究却尚未报道。

近年来的研究表明,氧化损伤在雷公藤诱导的毒性中扮演了重要的角色^[13-14]。考虑到转录因子 NF-E2 相关因子 2 (Nrf2) 作为抗氧化的重要转录因子^[15],其激活可介导下游抗氧化信号分子的表达。在此背景下,本研究旨在从心毒性的角度考察给予以上辅料炮制后对雷公藤的减毒作用,丰富炮制对雷公藤减毒的科学内涵,为多方面提高雷公藤的安全性提供实验支撑。此外,考虑到雷公藤的毒性成分目前主要是以雷公藤甲素为代表的脂溶性成分^[16-18],但也有认为其水溶性部位也引起了毒性反应^[6],因此,本研究选用散剂给药,以期能较全面反映雷公藤对心脏的毒性,以及炮制对雷公藤心毒性的减毒作用。

1 材料

SPF 级昆明 (KM) 小鼠,雄性,80 只,体质量

16~18 g,3~4 周龄,动物合格证号 SCXK(豫)2017-0001,购自河南省实验动物中心。

881Y-1 型远红外恒温干燥箱(吴江市华银烘箱制造厂),JX-FSTPRP-48 型全自动样品快速研磨仪(上海净信科技公司),TGL-16 M 型高速冷冻离心机(常州金坛良友仪器有限公司),Epoch 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司),Trans-Blot Turbo™ 全能型转印系统(美国 Bio-Rad 公司),Tanon-5200 全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司)。

雷公藤饮片(浙江,批号 160903)、金钱草饮片(四川,批号 160507)、白芍饮片(安徽,批号 190601)、甘草饮片(内蒙古,批号 20181202)经河南中医药大学药学院陈随清教授鉴定分别为卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* 根的木质部,报春花科植物过路黄 *Lysimachia christinae* 的干燥全草,毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* 的干燥根,豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根及根茎。

肌酸激酶(CK)测试盒(批号 20200704)、乳酸脱氢酶(LDH)测试盒(批号 20200709)、总蛋白定量(批号 20200709)、丙二醛(MDA)测定试剂盒(批号 20200709)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)试剂盒(批号 20191204)、微量还原型谷胱甘肽(GSH)试剂盒(批号 20200102)、谷胱甘肽-过氧化物酶(GPx)测试盒(批号 20200107)、谷胱甘肽-S 转移酶(GST)试剂盒(批号 20191205)均购自南京建成生物工程研究所。

RIPA 组织/细胞裂解液(批号 20200826)、4×蛋白质上样缓冲液(批号 20200902)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 20201215)均购自北京索莱宝科技有限公司;Nrf2 antibody(批号 42004)、HO-1

antibody(批号 42732)均购自美国 Gene Tex 公司; β -actin antibody(批号 00078629)购自美国 Proteintech Group 公司;Lamin B antibody(批号 AAD45161)购自美国 Bioworld 公司;Omni-ECL 超灵敏化学发光检测试剂盒(批号 014B1098)购自上海雅酶生物科技有限公司。

2 方法

2.1 雷公藤各炮制品及散剂的制备

2.1.1 雷公藤生品 净制,除去杂质和细小的药材,即得。

2.1.2 清炒雷公藤 参考 2020 年版《中国药典》^[19]炮制通则 0213 炒法中的清炒法。称取雷公藤饮片 150 g,置已预热炒锅内清炒至微焦,取出,置于远红外恒温干燥箱内 60 ℃至干(约需 2 h),即得清炒品。

2.1.3 醋炙雷公藤 参考 2020 年版《中国药典》^[19]炮制通则 0213 炒法中的醋炙法。称取雷公藤饮片 150 g,均匀喷洒米醋 30 g,闷润雷公藤饮片,待药液吸尽(约需 1 h),置已预热炒锅内文火炒至微带焦斑,取出,置于远红外恒温干燥箱内 60 ℃至干(约需 2 h),即得醋炙品。

2.1.4 金钱草、绿豆、白芍、甘草炒炙品 参考 2020 年版《中国药典》^[19]黄连项下萸黄连及文献^[20]莱菔子炮制雷公藤的炮制方法,制备雷公藤不同炮制品。称取金钱草、绿豆、白芍、甘草饮片各 15 g,加 8 倍体积纯净水浸泡 1 h,武火煮沸后,换文火煎煮 30 min,趁热过滤,相同步骤煎煮 3 次,合并滤液,浓缩至 30 mL,作为中药辅料药煎汤炒炙炮制药液(质量浓度 0.5 g·mL⁻¹)。称取雷公藤饮片 150 g,共 4 份,均匀喷洒以上已制备好的药液,闷润雷公藤饮片,待药液吸尽(约需 1 h),置已预热好的炒锅内炒至药材饮片表面不黏手(约需 10 min),取出,置于远红外恒温干燥箱内 60 ℃至干(约需 2 h),即得金钱草炒炙品、绿豆炒炙品、白芍炒炙品、甘草炒炙品。

2.1.5 散剂 取以上已制备好的雷公藤生品及各炮制品,分别用打粉机打碎成细粉,过 5 号筛(80 目),即得雷公藤生品及各炮制品散剂。将所得各炮制品散剂用生理盐水配制相应浓度,用保鲜膜密封在 4 ℃冰箱保存,作灌胃给药使用。

2.2 分组及给药

将 80 只 SPF 级雄性 KM 小鼠按体质量随机分

为 8 组,即正常组、雷公藤生品组、清炒品组、金钱草炒炙品、绿豆炒炙品、白芍炒炙品、甘草炒炙品、醋炙品组,每组 10 只,各组均以 2 g·kg⁻¹(以生药计)的剂量灌胃给予小鼠各炮制品散剂,根据实验室前期急性毒性试验结果证实在此剂量下可产生明显毒性^[21],给药体积均为 20 mL·kg⁻¹,正常组给予等体积的生理盐水,1 次/d,连续 28 d。

2.3 小鼠血清及心组织样本的采集

末次给药后 12 h 禁食不禁水,24 h 后摘眼球取血,静置 2 h 后,分离上层血清(3 500 r·min⁻¹离心 15 min 即得),并在颈椎脱臼法处死动物后,迅速取各组心组织,用预冷生理盐水洗去血渍并吸干,包好后置于-20 ℃冰箱保存直至分析使用。

2.4 血清 CK、LDH 的测定

取各组小鼠血清,按照试剂盒说明书比色法测定其吸光度,并按各自试剂盒对应的公式计算血清 CK、LDH 水平。

2.5 蛋白免疫印迹法检测小鼠心组织中 Nrf2、HO-1 蛋白表达

取小鼠心组织,加入 RIPA 裂解液,匀浆 15~20 s 后冰上静置 10 min,重复操作 3 次,于 4 ℃,12 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液用甲酸法测定蛋白浓度;蛋白样品煮沸变性;用 6%~12%的 SDS-PAGE 凝胶电泳,待其分离后,转移至 PVDF 膜上,用适量 1×TBST 稀释后的脱脂奶粉封闭,倒出封闭液并吸干,随后孵育一抗,4 ℃过夜。次日,用 TBST 缓冲液洗膜 4 次,每次 10 min,然后加入二抗在室温下孵育 1 h,洗膜后取适量等体积的 eECL-A 液和 eECL-B 液于 EP 管中配成化学发光液充分混匀,置于曝光仪器中进行曝光,保存图片并分析灰度值。运用 Image Lab 3.0 系统工具,计算各个蛋白目的条带与相应的内参条带灰度值之比。

2.6 心蛋白含量的测定

取各组小鼠心组织,制成 10%的组织匀浆液。取 10%的匀浆液稀释成 1%的匀浆液。按试剂盒说明书考马斯亮蓝法测定其吸光度,并按公式计算心组织中待测蛋白含量。

2.7 心脂质过氧化和抗氧化相关指标测试

取 2.6 项下 10%的心组织匀浆液,按照试剂盒说明书硫代巴比妥酸(TBA)法测定匀浆液吸光度,并按公式除以 2.6 项下所测心组织的蛋白含

量,计算心组织中 MDA 水平;取 1%的心组织匀浆液,按照试剂盒说明书羟胺法测定匀浆液吸光度,并按公式除以 2.6 项下所测心组织的蛋白含量,计算心组织中 T-SOD 水平;取 10%的心组织匀浆液,按照试剂盒说明书可见光比色法测试匀浆液吸光度,并按各自试剂盒对应的公式除以 2.6 项下所测心组织的蛋白含量,计算心组织中 GSH、GPx、GST 的水平。

2.8 统计分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学处理,计量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),若方差齐性,采用最小显著性差异(LSD)法,若方差非齐性,采用 Dunnett's T3 检验,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

表 1 炮制对雷公藤诱导的小鼠血清 CK、LDH 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effects of processing on serum creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) levels of mice induced by radix *Tripterygium wilfordii* ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CK		LDH	
		水平/U·mL ⁻¹	毒性下降率/%	水平/U·L ⁻¹	毒性下降率/%
正常	-	24.579±8.136	-	847.534±167.534	-
生品	2	82.302±11.515 ²⁾	-	1745.291±236.086 ²⁾	-
清炒品	2	76.716±12.257 ^{6,8,10,13)}	6.8	1672.646±204.832 ^{6,8,9,14)}	4.2
金钱草炒炙品	2	51.843±14.752 ⁴⁾	37.0	1183.229±139.648 ⁴⁾	32.2
绿豆炒炙品	2	53.497±16.223 ⁴⁾	35.0	1468.161±158.364 ^{4,6)}	15.9
白芍炒炙品	2	58.972±13.273 ⁴⁾	28.3	1491.480±138.687 ^{4,6)}	14.5
甘草炒炙品	2	68.492±9.705 ^{3,6,8)}	16.8	1547.085±139.407 ^{3,6)}	11.4
醋炙品	2	62.667±9.538 ⁴⁾	23.9	1348.879±161.557 ^{4,5,11)}	22.7

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与生品组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与金钱草炒炙品组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$;与绿豆炒炙品组比较⁷⁾ $P<0.05$,⁸⁾ $P<0.01$;与白芍炒炙品组比较⁹⁾ $P<0.05$,¹⁰⁾ $P<0.01$;与甘草炒炙品组比较¹¹⁾ $P<0.05$,¹²⁾ $P<0.01$;与醋炙品组比较¹³⁾ $P<0.05$,¹⁴⁾ $P<0.01$ (图 1,表 2,3 同)。

3.2 炮制逆转了雷公藤诱导的小鼠心 Nrf2、HO-1 蛋白的异常表达

与正常组比较,雷公藤生品组显著下调小鼠心 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平($P<0.01$);与生品组比较,分别给予金钱草炒炙品、甘草炒炙品干预后,可显著上调小鼠心 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平($P<0.05, P<0.01$);而在给予绿豆炒炙品、醋炙品干预后显著上调心 Nrf2 蛋白表达水平($P<0.05$);给予白芍炒炙品干预后仅可显著上调心 HO-1 蛋白表达水平($P<0.01$),而经清炒品干预虽可升高 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平,但无显著差异;此外,金钱草炒炙品与绿豆炒炙品分别干预后,心 Nrf2 蛋白表达水

3 结果

3.1 炮制降低了雷公藤诱导的小鼠心毒性

与正常组比较,雷公藤生品连续给药 28 d 致使小鼠血清 CK、LDH 水平显著升高($P<0.01$);与生品组比较,分别给予金钱草炒炙品、绿豆炒炙品、白芍炒炙品、甘草炒炙品、醋炙品干预后致使血清 CK、LDH 水平显著降低($P<0.05, P<0.01$),而给予清炒品干预后对血清 CK、LDH 虽有降低趋势,但无显著差异;此外,金钱草炒炙品与绿豆炒炙品、白芍炒炙品、醋炙品分别干预后,血清 CK 在此 4 组之间互相比均无显著差异;而金钱草炒炙品与绿豆炒炙品、白芍炒炙品、甘草炒炙品、醋炙品分别干预后,血清 LDH 在此 5 组之间互相比均均有显著差异;就对 CK、LDH 的相对变化率而言,均以金钱草炒炙品的变化率为最高,依次为 37.0%、32.2%,见表 1。

平在此 2 组之间互相比均无显著差异;而金钱草炒炙品与绿豆炒炙品、白芍炒炙品、甘草炒炙品、醋炙品分别干预后,心 HO-1 蛋白表达水平在此 5 组之间互相比均均有显著差异;就对 Nrf2、HO-1 的相对变化率而言,均以金钱草炒炙品的变化率为最高,依次为 210.7%、1094.4%,见图 1。

3.3 炮制逆转了雷公藤诱导的小鼠心脂质过氧化及抗氧化水平低下

与正常组比较,雷公藤生品连续给药 28 d 致使小鼠心脂质过氧化产物 MDA 水平显著升高($P<0.01$),主要抗氧化酶 T-SOD 水平显著降低($P<0.01$);与生品组比较,分别给予金钱草炒炙品、绿

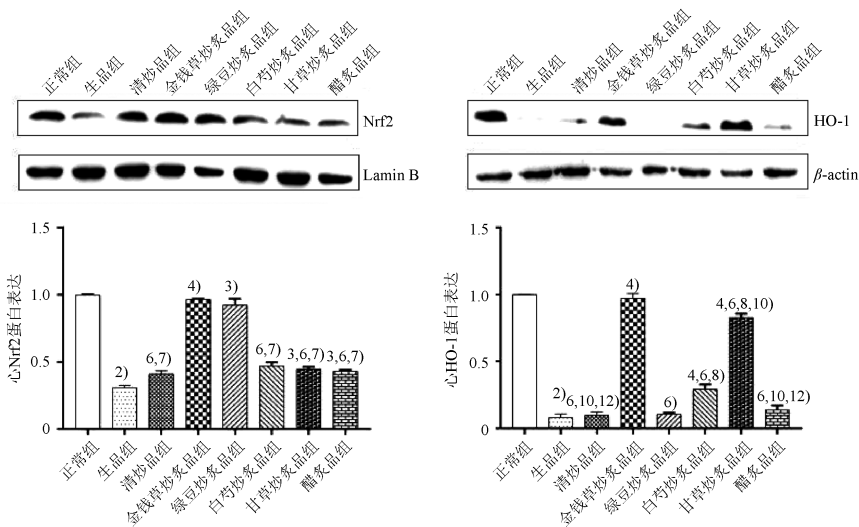


图1 炮制对雷公藤诱导的小鼠心 Nrf2、HO-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 1 Effects of processing on the expression levels of Nrf2 and HO-1 in heart of mice induced by radix *Tripterygium wilfordii* ($\bar{x}\pm s, n=3$)

豆炒炙品、白芍炒炙品、醋炙品干预后可致使小鼠心 MDA 水平显著降低、T-SOD 水平显著升高 ($P<0.05, P<0.01$), 给予甘草炒炙品干预后仅致使心 T-SOD 水平显著升高 ($P<0.05$), 而经清炒品干预后虽可降低 MDA 水平, 升高 T-SOD 水平, 但无显著差

异; 此外, 金钱草炒炙品与绿豆炒炙品、白芍炒炙品、甘草炒炙品、醋炙品分别干预后, 心 MDA、T-SOD 在此 5 组之间互相比均无显著差异; 就对心 MDA、T-SOD 的相对变化率而言, 均以金钱草炒炙品的变化率为最高, 依次为 29.3%、52.8%, 见表 2。

表2 炮制对雷公藤诱导的小鼠心脂质过氧化及抗氧化水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effects of processing on the lipid peroxidation and antioxidant levels in heart of mice induced by radix *Tripterygium wilfordii* ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	MDA		T-SOD	
		水平/ $nmol\cdot mg^{-1}\ prot$	毒性下降率/%	水平/ $U\cdot mg^{-1}\ prot$	升高率/%
正常	-	3.762±1.065	-	173.582±30.892	-
生品	2	7.818±1.728 ²⁾	-	99.983±31.036 ²⁾	-
清炒品	2	7.016±1.581 ³⁾	10.3	112.367±23.771 ^{6,13)}	12.4
金钱草炒炙品	2	5.529±1.728 ⁴⁾	29.3	152.783±32.253 ⁴⁾	52.8
绿豆炒炙品	2	6.185±1.859 ³⁾	20.9	131.599±22.010 ³⁾	31.6
白芍炒炙品	2	6.239±1.746 ³⁾	20.2	130.697±33.003 ³⁾	30.7
甘草炒炙品	2	6.563±1.592	16.1	134.194±33.581 ³⁾	34.2
醋炙品	2	6.083±1.693 ³⁾	22.2	141.643±39.410 ⁴⁾	41.7

3.4 炮制逆转了雷公藤诱导的小鼠心谷胱甘肽相关的抗氧化水平

与正常组比较, 雷公藤生品连续给药 28 d 致使小鼠心谷胱甘肽抗氧化水平 GSH、GPx、GST 水平均显著降低 ($P<0.01$); 与生品组比较, 分别给予金钱草炒炙品、绿豆炒炙品、甘草炒炙品干预后致使小鼠心 GSH、GPx、GST 水平均显著升高 ($P<0.05, P<$

0.01), 给予醋炙品干预后致使小鼠心 GPx、GST 水平显著升高 ($P<0.05, P<0.01$), 而给予白芍炒炙品干预后仅致使小鼠心 GPx 水平显著升高 ($P<0.05$); 此外, 金钱草炒炙品与绿豆炒炙品、白芍炒炙品、甘草炒炙品、醋炙品分别干预后, 心 GSH、GPx、GST 在此 5 组之间互相比均无显著差异; 就对 GSH、GPx、GST 的相对变化率而言, 均以金钱草

炒炙品的变化率为最高,依次 51.2%、74.9%、75.5%,见表 3。

表 3 炮制对雷公藤诱导的小鼠心谷胱甘肽相关的抗氧化水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effects of processing on the glutathione-related antioxidant levels in heart of mice induced by radix *Tripterygium wilfordii* ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	GSH		GPx		GST	
		水平/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{prot}$	升高率/%	水平/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot}$	升高率/%	水平/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot}$	升高率/%
正常	-	9.879±2.816	-	804.561±133.561	-	99.725±22.714	-
生品	2	5.501±2.475 ²⁾	-	375.226±143.805 ²⁾	-	49.023±26.863 ²⁾	-
清炒品	2	6.063±1.131 ⁵⁾	10.2	380.369±172.085 ^{6,7,9,12,14)}	1.4	54.410±27.017 ⁶⁾	11.0
金钱草炒炙品	2	8.319±1.646 ⁴⁾	51.2	656.222±154.617 ⁴⁾	74.9	86.043±25.063 ⁴⁾	75.5
绿豆炒炙品	2	7.804±2.338 ³⁾	41.9	531.134±121.833 ³⁾	41.6	76.376±26.736 ³⁾	55.8
白芍炒炙品	2	6.583±2.259	19.7	528.901±133.587 ³⁾	41.0	67.377±21.005	37.4
甘草炒炙品	2	7.627±2.560 ³⁾	38.7	620.033±158.625 ⁴⁾	65.2	72.054±24.897 ³⁾	47.0
醋炙品	2	7.193±2.670	30.8	631.093±158.226 ⁴⁾	68.2	71.996±27.202 ³⁾	46.9

4 讨论

临床研究发现,服用雷公藤中毒后可出现心前区疼痛、心律失常,甚至顽固性心源性休克^[22]等症状。如何降低雷公藤的心毒性已成为目前亟待解决的问题。鉴于目前针对雷公藤心毒性的研究还相对甚少,因此,本研究从心毒性的角度首次考察炮制对雷公藤的减毒作用,并证实分别经金钱草炒炙品、绿豆炒炙品、白芍炒炙品、甘草炒炙品、醋炙品干预后,均在不同程度上降低雷公藤诱导的心毒性,且以金钱草炒炙品的减毒作用更佳。

血清 CK、LDH 水平是心脏损伤的生物标志物,可反映心脏受损程度^[23],当其显著升高时,常可提示致心毒性,而如果一个药物能显著逆转血清过高水平的 CK 和 LDH 常用来表征这个药物对心毒性具有减毒作用^[24-29]。鉴于此,本研究通过以血清 CK、LDH 为心损伤指标,探索炮制对雷公藤心毒性的减毒作用。结果显示,给予雷公藤生品连续给药 28 d 后致使小鼠血清 CK、LDH 水平显著升高,说明雷公藤诱导了心毒性。就不同炮制品的干预情况而言,给予金钱草炒炙品、绿豆炒炙品、白芍炒炙品、甘草炒炙品、醋炙品干预后,血清 CK、LDH 水平均被显著逆转,其中对 CK 分别降低 37.0%、35.0%、28.3%、16.8%、23.9%,对 LDH 分别降低 32.2%、15.9%、14.5%、11.4%、22.7%,尤以金钱草炒炙品对血清 CK、LDH 的逆转为最高,而金钱草炒炙品相较于其他炮制品对 CK 分别降低了 2.0%、8.7%、20.2%、13.1%,对 LDH 分别降低了 16.3%、17.7%、20.8%、9.5%。表明给予以上炮制品干预后均可显

著逆转雷公藤诱导的心毒性,且以金钱草炒炙品的逆转率为最高,在一定程度上提示金钱草炒炙品的减毒作用更佳。

越来越多的研究表明,氧化应激在雷公藤诱导的毒性中占据重要作用^[13-14]。另有研究证实,当体内抗氧化防御能力不足以清除自由基时,氧化与抗氧化失衡而处于氧化应激状态,导致氧化损伤^[6]。Nrf2 作为氧化应激中的一个关键转录因子,可调节机体变化所引起的氧化应激反应^[15]。鉴于此,本研究试图从主要抗氧化转录因子 Nrf2 及其下游靶基因 HO-1 的蛋白表达水平探讨炮制对雷公藤诱导的心毒性的减毒机制。结果显示,雷公藤生品连续给药 28 d 后致使小鼠心 Nrf2 蛋白表达水平显著下调, Nrf2 下游抗氧化信号分子 HO-1、T-SOD、GSH、GPx、GST 水平显著降低,提示雷公藤诱导的心毒性涉及抗氧化系统的弱防御。就不同炮制品的干预情况而言,给予金钱草炒炙品、绿豆炒炙品、甘草炒炙品、醋炙品干预后,心 Nrf2 蛋白表达水平显著升高 210.7%、196.9%、44.5%、38.7%;给予金钱草炒炙品、白芍炒炙品、甘草炒炙品干预后,心 HO-1 蛋白表达水平显著升高 1 094.4%、261.1%、916.6%;给予金钱草炒炙品、绿豆炒炙品、白芍炒炙品、甘草炒炙品、醋炙品干预后,心 T-SOD、GPx 水平被显著逆转,对 T-SOD 分别升高 52.8%、31.6%、30.7%、34.2%、41.7%,对 GPx 分别升高 74.9%、41.6%、41.0%、65.2%、68.2%;给予金钱草炒炙品、绿豆炒炙品、甘草炒炙品干预后,心 GSH 水平被显著逆转,对 GSH 分别升高 51.2%、41.9%、38.7%;给予金钱

草炒炙品、绿豆炒炙品、甘草炒炙品、醋炙品干预后,心 GST 水平被显著逆转,对 GST 分别升高 75.5%、55.8%、47.0%、46.9%,尤以金钱草炒炙品对心 Nrf2、HO-1、T-SOD、GSH、GPx、GST 水平的逆转为最高,而金钱草炒炙品相较于其他炮制品对 Nrf2 分别升高了 13.8%、159.3%、166.2%、172.0%,对 HO-1 分别升高了 1 065.1%、833.3%、177.8%、1 021.1%,T-SOD 分别升高了 21.2%、22.1%、18.6%、11.1%,对 GSH 分别升高了 9.3%、31.5%、12.5%、20.4%,对 GPx 分别升高了 33.3%、33.9%、9.7%、6.7%,对 GST 分别升高了 19.7%、38.1%、28.5%、28.6%,说明以上辅料的减毒机制可能与 Nrf2 介导的抗氧化防御上调有关。另外,在本研究中,雷公藤生品给药还诱导了小鼠心脂质过氧化损伤,表现在 MDA 含量显著升高;而在给予金钱草炒炙品、绿豆炒炙品、白芍炒炙品、醋炙品炮制后,显著逆转了升高的 MDA 水平,对 MDA 水平分别降低了 29.3%、20.9%、20.2%、22.2%,而金钱草炒炙品相较于其他炮制品对 MDA 分别降低了 8.4%、9.1%、7.1%,表明给予以上炮制品干预后均在不同程度上发挥清除氧自由基及脂质过氧化作用,且金钱草炒炙品相较于其他炮制品各指标的逆转为最高,在一定程度上提示金钱草炒炙品的减毒作用更佳。事实上,考虑到抗氧化剂转录因子 Nrf2 本身具有抑制脂质过氧化损伤的作用,进一步说明以上辅料的减毒作用可能与上调 Nrf2 介导的抗氧化防御和减轻氧化损伤有关。

为何金钱草、绿豆、白芍、甘草、米醋炒炙雷公藤可逆转雷公藤诱导的心毒性,且以金钱草炒炙品的减毒作用更佳?这可能与其本身的性味、功效及所含成分有关。首先,在中医药理论指导下,金钱草杀雷公藤毒属于中药“相杀”配伍范畴^[30],金钱草甘淡、微寒,可清热利湿、利尿通淋,雷公藤性味辛苦,二者合用以达到“异效相制”之法^[31]。此外,动物实验研究发现,金钱草具有抗氧化应激、减轻肾损伤的作用^[32]。另有研究证实^[33]金钱草乙醇提取物对雷公藤多苷致肝损伤具有保护作用,其作用机制可能与降低小鼠肝脂质过氧化、增强主要抗氧化酶 SOD 及 CAT 活力有关。绿豆历来被广泛用于解药食中毒。白芍、米醋味酸,与辛味药雷公藤配伍,二者宣中有敛,散中有收,一开一合,以达到“辛酸相制”之法^[15],祛邪而不伤正,且米醋具有理气止痛、消食解

毒的作用^[34],常用于降低毒性、减少毒副作用。甘草味甘,可调和诸药,缓急解毒,雷公藤辛苦开散、易耗气津,二者配伍护气津而制其走窜,行气而不伤气津,达到“苦甘相制”之法^[35],可调其偏性、制其毒性,以降低雷公藤诱导的心毒性,且研究证实^[36]甘草中的黄酮类物质具有较好的抗氧化作用,可有效改善氧化损伤。马哲等^[37]研究发现雷公藤与甘草配伍后,雷公藤甲素的半衰期延长而最大血药浓度降低,通过缓慢释放雷公藤甲素的方式,延长作用时间,以达到增效减毒的目的。

综上,本研究首次考察了不同炮制方法对雷公藤诱导的心毒性的减毒作用及机制,得到金钱草、绿豆、白芍、甘草、米醋炮制雷公藤后,均在不同程度上降低其毒性,且以金钱草炒炙品的减毒作用更佳,减毒机制可能与上调 Nrf2 所介导的心抗氧化防御并减轻氧化损伤有关。本研究将为多方面提高雷公藤的安全性提供一定的实验支撑。另外,进一步探究炮制对雷公藤诱导的心毒性动物组织病理形态的影响以及深入的炮制减毒机制,无疑是以后值得关注的一个重要的研究方向。

[参考文献]

- [1] 马致洁,董捷鸣,王伽伯,等.基于高内涵分析的甘草炮制雷公藤减毒作用研究[J].中国现代中药,2017,19(11):1562.
- [2] 何康婧,高增平,尹丽梅,等.雷公藤多苷的药理毒理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(1):196.
- [3] 彭德明.中药配伍方法应用于雷公藤减毒研究分析[J].中国处方药,2020,18(7):20.
- [4] 关伟,戴清保,胡永良,等.雷公藤甲素对大鼠心肌毒性的时间节律性研究[J].皖南医学院学报,2010,29(1):18.
- [5] 刘昕彦,邵瑞,贺爽,等.类器官和立体细胞模型在中药心脏毒性评价中的应用前景[J].药学学报,2019,54(11):1888.
- [6] 杜云艳,孙淑萍,殷传刘,等.Nrf2/HO-1通路介导的及己根与雷公藤水提取物致大鼠心脏毒性的比较研究[J].通化师范学院学报,2020,41(4):13.
- [7] 王君明,李金洋,蔡泓,等.雷公藤“以药制药”炮制减毒作用机制研究[J].中华中医药学刊,2020,38(5):37.
- [8] 周艳丽,张磊,刘维.白芍总苷对雷公藤多苷片所致小鼠急性肝损伤保护作用的实验研究[J].天津中医药,2007,24(1):61.
- [9] 赵小梅,宫嫚,董捷鸣,等.甘草炮制雷公藤降低其肝毒性作用的初步研究[J].中国中药杂志,2017,42(1):119.
- [10] 朱锡龙,李煌,张勋,等.雷公藤不同炮制品中雷公藤甲素与雷公藤红素含量的高效液相色谱法测定[J].时珍国医国药,2014,25(2):341.

- [11] 王君明, 李金洋, 蔡泓, 等. 雷公藤“以药制药”炮制减毒作用的整体评价[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(9): 2152.
- [12] 王君明, 李金洋, 张月月, 等. 基于 PCA 和 GCA 分析方法初步评价雷公藤“以药制药”炮制减毒作用[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(6): 1349.
- [13] 陈琪, 孙满强, 李世超, 等. 地黄水提取物对雷公藤甲素致肝损伤的减毒作用及抗氧化机制[J]. 上海中医药大学学报, 2020, 34(4): 47.
- [14] WANG J M, LI J Y, CAI H, et al. Nrf2 participates in mechanisms for reducing the toxicity and enhancing the antitumour effect of radix *Tripterygium wilfordii* to S180-bearing mice by herbal-processing technology [J]. Pharm Biol, 2019, 57(1): 437.
- [15] 谭亲友, 刘兵, 张靖, 等. 基于 Nrf2 信号通路探讨异甘草酸镁对雷公藤甲素损伤 L-02 细胞中相关蛋白表达的影响[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(2): 138.
- [16] 关月晨, 王君明, 宋玲玲, 等. 金钱草煎汤炒炙雷公藤的炮制减毒工艺研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(5): 1128.
- [17] 王亚丹, 汪祺, 张建宝, 等. 雷公藤制剂的化学成分及质量研究现状[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16): 3368.
- [18] 高原, 陈学国, 滕姣, 等. 雷公藤中毒与毒性成分检验研究进展[J]. 福建分析测试, 2019, 28(6): 13.
- [19] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [20] 南丽红, 郑燕芳, 徐伟, 等. 不同炮制方法对雷公藤的急性毒性和抗炎作用的影响[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(6): 1900.
- [21] 王君明, 李金花, 李金洋, 等. 基于主成分分析评价雷公藤配伍金钱草的相杀减毒作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(21): 1.
- [22] 陈远辉. 急性雷公藤中毒致心源性休克 3 例报告[J]. 福建医药杂志, 1999, 21(3): 56.
- [23] 高润霖. 急性心肌梗死诊断和治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2001, 29(12): 9.
- [24] 李妍怡, 李俊俊, 戈福星, 等. 心肌细胞损伤的体外模型研究新进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(13): 3257.
- [25] LONG G, CHEN H, WU M, et al. Antianemia drug roxadustat (FG-4592) protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by targeting antiapoptotic and antioxidative pathways [J]. Front Pharmacol, 2020, 5(11): 1191.
- [26] ZHOU Q, SONG J, WANG Y, et al. Remifentanyl attenuates cardiac dysfunction, lipid peroxidation and immune disorder in rats with isoproterenol-induced myocardial injury via JNK/NF- κ B p65 inhibition [J]. Ann Transl Med, 2020, 8(8): 551.
- [27] ASMARI A F, ALI N, ALI SMARI F, et al. Liraglutide attenuates gefitinib-induced cardiotoxicity and promotes cardioprotection through the regulation of MAPK/NF- κ B signaling pathways [J]. Saudi Pharm J, 2020, 28(4): 509.
- [28] LIAO D, ZHANG C, LIU N, et al. Involvement of neurotrophic signaling in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. Exp Ther Med, 2020, 19(2): 1129.
- [29] YU W, QIN X, ZHANG Y, et al. Curcumin suppresses doxorubicin-induced cardiomyocyte pyroptosis via a PI3K/Akt/mTOR-dependent manner [J]. Cardiovasc Diagn Ther, 2020, 10(4): 752.
- [30] 钟赣生. 中药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 38.
- [31] 李桓, 周学平, 陆艳. 雷公藤“异类相制”配伍减毒作用探讨[J]. 中医杂志, 2015, 56(1): 10.
- [32] ZHOU J, JIN J, LI X, et al. Total flavonoids of *Desmodium styracifolium* attenuates the formation of hydroxy-L-proline-induced calcium oxalate urolithiasis in rats [J]. Urolithiasis, 2018, 46(3): 231.
- [33] 王君明, 刘菊, 崔琰, 等. 金钱草提取物对雷公藤多苷致肝损伤的保护作用及机制研究[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(1): 30.
- [34] 李慧杰, 洪坤, 李晓强, 等. 雷公藤内酯酮的药理活性及其机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(6): 234.
- [35] 许坡, 孟楣, 张静, 等. 基于“性味理论”探讨雷公藤配伍减生殖毒性的研究进展[J]. 中国药房, 2016, 27(10): 1412.
- [36] 曹玲娟, 颜苗, 李焕德, 等. 雷公藤致肝损伤及与甘草配伍减毒机制的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(13): 2537.
- [37] 马哲. 雷公藤配伍甘草减毒增效研究[D]. 大连: 辽宁中医药大学, 2011.

[责任编辑 孔晶晶]