

# HMGB1介导的炎症通路在雷公藤致大鼠肝损伤中的作用研究

董捷鸣\*,章从恩,于小红,吴昊,马致洁,赵奎君<sup>#</sup>(首都医科大学附属北京友谊医院中药剂科,北京 100050)

中图分类号 R965.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)05-0633-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.05.14

**摘要** 目的:研究高迁移率族蛋白B1(HMGB1)介导的炎症通路HMGB1-Toll样受体4(TLR4)/核转录因子κB(NF-κB)在雷公藤致大鼠肝损伤中的作用,为阐明雷公藤致肝损伤的作用机制提供参考。方法:将24只SD大鼠随机分为空白组(生理盐水,灌胃)、雷公藤组(以生药计16 g/kg,灌胃)和中和剂组(腹腔注射100 mg/kg甘草酸铵溶液3 h后再灌胃以生药计16 g/kg的雷公藤),每组8只,各组大鼠均连续给药3周。每周给药后均检测大鼠血清中天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸转氨酶(ALT)水平;给药结束后,采用酶联免疫吸附法检测大鼠血清中HMGB1、白细胞介素1β(IL-1β)、IL-2、肿瘤坏死因子α(TNF-α)水平,Western blot法检测大鼠肝组织中HMGB1、NF-κB p65、TLR4蛋白表达,苏木精-伊红染色后观察大鼠肝组织病理学改变。结果:给药3周后,雷公藤组大鼠血清中AST、ALT、HMGB1、IL-1β、IL-2、TNF-α水平以及肝组织中HMGB1、NF-κB p65、TLR4蛋白表达水平均显著高于空白组和中和剂组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。雷公藤组大鼠肝组织中央静脉周围肝细胞水肿,部分肝细胞浆内可见圆形空泡;中和剂组大鼠仅少量细胞内可见大小不一的空泡。结论:雷公藤致大鼠肝损伤的机制可能与其激活了HMGB1-TLR4/NF-κB炎症通路有关。**关键词** 雷公藤;肝损伤;高迁移率族蛋白1;Toll样受体4;核转录因子κB;大鼠

## Study on the Effects of HMGB1-mediated Inflammatory Pathway on Liver Injury Induced by *Tripterygium wilfordii*

DONG Jieming, ZHANG Cong'en, YU Xiaohong, WU Hao, MA Zhijie, ZHAO Kuijun (Dept. of TCM Pharmacy, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effects of high-mobility group box 1 protein (HMGB1)-mediated inflammatory pathway HMGB1-Toll like receptor 4 (TLR4)/nuclear transcription factor κB (NF-κB) on liver injury of rats induced by *Tripterygium wilfordii*, and to provide reference for clarify the mechanism of liver injury induced by *T. wilfordii*. METHODS: Totally 24 SD rats were randomly divided into blank group (normal saline, i.g.), *T. wilfordii* group (16 g/kg by crude drug, i.g.) and neutralizer group (16 g/kg *T. wilfordii* crude drug i.g. after i.p injection of 100 mg/kg Ammonium glycyrrhizinate solution 3 h), with 8 rats in each group. All rats were treated for consecutive 3 weeks. The serum levels of AST and ALT in rats were detected every week. After the end of medication, the serum levels of HMGB1, IL-1β, IL-2 and TNF-α were detected by ELISA method; the protein expression of HMGB1, NF-κB p65 and TLR4 in liver tissue of rats were detected by Western blot assay. The pathological changes of liver tissue in rats were measured with HE staining method. RESULTS: After 3 weeks of treatment, the serum levels of AST, ALT, HMGB1, IL-1β, IL-2 and TNF-α in rats, the protein expression of HMGB1, NF-κB p65 and TLR4 in liver tissue of rats in *T. wilfordii* group were significantly higher than blank group and neutralizer group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Hepatocyte edema was found around the central vein of the liver, and circular vacuoles were seen in some hepatic cytoplasm in *T. wilfordii* group; only varying size of vacuoles were found in a small number of cells in neutralizer group. CONCLUSIONS: *T. wilfordii* induced liver injury may be associated with the activation of HMGB1-TLR4/NF-κB inflammation pathway.

**KEYWORDS** *Tripterygium wilfordii*; Liver injury; High-mobility group box 1 protein; Toll like receptor 4; Nuclear transcription factor κB; Rats

during post-MI remodeling in the mouse[J]. *J Cell Biochem*, 2010, 109(6): 1185-1191.

[14] BIERNACKA A, DOBACZEWSKI M, FRANGOGIANNIS NG. TGF-β signaling in fibrosis[J]. *Growth Factors*

\* 硕士研究生。研究方向:中药肝毒性。电话:010-63138562。  
E-mail: dongjieming5428@sina.com

# 通信作者:主任药师,硕士。研究方向:临床中药标准化。电话:010-63138562。E-mail: 13811647091@163.com

tors, 2011, 29(5): 196-202.

[15] ZHOU H, CHEN X, CHEN LZ, et al. Anti-fibrosis effect of scutellarin via inhibition of endothelial-mesenchymal transition on isoprenaline-induced myocardial fibrosis in rats[J]. *Molecules*, 2014, 19(10): 15611-15623.

(收稿日期:2017-08-08 修回日期:2017-12-01)

(编辑:林静)

雷公藤为卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook.F.的干燥根茎,首载于《神农本草经》<sup>[1]</sup>。雷公藤在治疗自身免疫性疾病(如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮)上有显著且独特的疗效<sup>[2-3]</sup>,但其对肝、肾以及生殖器官具有一定毒性,在传统中药中毒性名列前位<sup>[4-5]</sup>,从而制约了其临床应用。目前研究认为,雷公藤甲素、雷公藤红素、雷公藤生物碱等是雷公藤致毒的主要成分<sup>[6-7]</sup>。笔者前期对雷公藤肝毒性的物质基础也进行了相关研究<sup>[8-9]</sup>,证实了雷公藤甲素、雷公藤红素可能是雷公藤致肝损伤的关键成分,且发现雷公藤致肝损伤后炎症因子[白细胞介素1(IL-1)、IL-6、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )]水平升高。而IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 是高迁移率族蛋白B1(HMGB1)引起肝脏炎症损伤的主要下游炎症因子<sup>[10-12]</sup>。故笔者推测由HMGB1介导的炎症通路HMGB1-Toll样受体4(TLR4)/核转录因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)可能是雷公藤致肝损伤的关键通路。有报道显示,甘草酸铵能有效抑制HMGB1表达<sup>[13]</sup>。故在本研究中笔者选用甘草酸铵为HMGB1抑制剂,抑制HMGB1-TLR4/NF- $\kappa$ B通路激活,观察肝组织炎症发生情况以及通路相关蛋白的表达情况,为更好地了解雷公藤致肝损伤的机制以及更有针对性地选择减轻雷公藤肝毒性的方法提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Epoch酶标仪(美国BioTek公司);PL-203电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];Neofuge 15R台式高速冷冻离心机(香港力康生物医疗控股有限公司);Chemray 240全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科技有限公司);5424R离心机(德国Eppendorf公司);CKX41光学显微镜(日本Olympus公司)。

### 1.2 药材与试剂

雷公藤药材于2016年1月采自福建三明市,经北京友谊医院中药剂科主任赵奎君教授鉴定为卫矛科植物雷公藤的干燥根茎;甘草酸铵标准品(美国Sigma公司,批号:101843996,纯度: $\geq 95\%$ );大鼠HMGB1试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司,批号:AK0017CT13009);大鼠IL-1 $\beta$ 、IL-2酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(湛江科联生物科技有限公司,批号:221070422、221070411);大鼠肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )ELISA试剂盒(美国eBioscience公司,批号:4331720);兔HMGB1一抗、大鼠TLR4一抗(赛维尔生物科技有限公司,批号:03517061401、177224);大鼠NF- $\kappa$ B p65一抗(美国CST公司,批号:06/2017);山羊抗兔鼠通用二抗(丹麦Dako公司,批号:20039581);天冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒(批号:2017007)、丙氨酸转氨酶(ALT)试剂盒(批号:201700)均购自长春汇力公司;其余试剂均为分析纯。

### 1.3 动物

SPF级SD大鼠24只,♂,4~5周龄,体质量(200 $\pm$ 20)g,由华阜康生物科技股份有限公司提供(动物合格证号:11401300054115)。购入后将大鼠分笼饲养于北京友谊医院动物实验中心SPF级实验室,每笼4只,饲养期间维持室内温度为25℃、相对湿度约为50%、12h昼夜灯光交替。饲料为实验室提供的大鼠专用饲料,每周换笼清洁2次。

## 2 方法

### 2.1 溶液的制备

(1)雷公藤溶液:称取打碎成1~2cm碎块的雷公藤2500g,分批煎煮,先加入8倍量水提前浸泡30min,然后煎煮30min,用孔径为0.25cm药筛过滤,收集滤液,药渣再加入8倍水煎煮30min,同等条件过滤,合并2次滤液。最后将所得滤液浓缩成以生药量为1.6g/mL的药液,备用。(2)甘草酸铵溶液:精密称取甘草酸铵标准品15g,加生理盐水制备成100mg/mL溶液,超声使其充分溶解,备用。

### 2.2 分组与给药

将24只大鼠随机分为空白组(生理盐水,灌胃)、雷公藤组(以生药计16g/kg,灌胃)<sup>[9]</sup>、中和剂组(腹腔注射100mg/kg甘草酸铵3h后再灌胃以生药计16g/kg的雷公藤溶液)<sup>[14]</sup>,每组8只。3组大鼠均连续灌胃3周,期间正常饮食饮水。

### 2.3 血清中AST、ALT含量检测

每周给药后对大鼠尾静脉取血,将血液静置2h,以845 $\times$ g离心10min,取上清,采用全自动生化分析仪检测大鼠血清中AST、ALT含量。

### 2.4 血清中HMGB1、IL-1 $\beta$ 、IL-2、TNF- $\alpha$ 水平检测

末次给药后,大鼠禁食不禁水12h,然后腹腔注射10%水合氯醛麻醉大鼠,采用促凝采血针于下腔静脉取血,常温静置2h,845 $\times$ g离心10min,取上清,-80℃冰箱中保存,备用。采用ELISA法检测血清中HMGB1、IL-1 $\beta$ 、IL-2、TNF- $\alpha$ 水平,具体操作按照试剂盒说明书进行。

### 2.5 大鼠肝组织病理学观察

将大鼠处死后取肝组织,分离肝右上叶,以4%甲醛溶液固定,经过脱水、石蜡包埋、切片(厚度4 $\mu$ m)、苏木精-伊红(HE)染色、透明、封片等步骤后,在200倍显微镜下拍照分析,观察大鼠肝组织病理学变化。

### 2.6 肝组织中HMGB1、NF- $\kappa$ B p65、TLR4蛋白表达水平检测

采用Western blot法检测大鼠肝组织中HMGB1、NF- $\kappa$ B p65、TLR4蛋白表达。取剩余肝组织剪成小块,加入蛋白裂解液后置于匀浆器中匀浆处理,用移液器将匀浆液转移至1.5mL离心管中,振荡,冰浴30min,期间用移液器反复吹打,确保细胞完全裂解,然后以12000 $\times$ g

离心 10 min, 收集上清(即总蛋白溶液)。取 6.0 μL 蛋白溶液进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳(浓缩胶电压为 75 V, 分离胶为 120 V), 转膜, 加入一抗(HMGB1 和 TLR4 稀释比例均为 1:1 000, NF-κB p65 稀释比例为 1:500), 4 ℃ 孵育过夜, 用 TBST 缓冲液清洗 3 次, 每次 5 min; 然后加入二抗(1:3 000), 室温下孵育 30 min 后, 用 TBST 缓冲液清洗 3 次, 每次 5 min; 然后再经过化学发光等步骤得到凝胶图像, 采用 alphaEaseFC 灰度分析软件检测条带灰度值, 最终结果以目的条带与内参 β-肌动蛋白(β-actin)条带灰度值的比值表示各蛋白表达水平。

## 2.7 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  的形式表示, 采用单因素方差分析和 *t* 检验进行组间比较。P<0.05 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 血清中 ALT、AST 含量检测结果

雷公藤组大鼠在给药 2 周后血清中 ALT、AST 含量显著高于空白组(P<0.05 或 P<0.01), 并且给药 2 周后血清中 AST 含量以及给药 3 周后血清中 ALT、AST 含量均显著高于中和剂组, 然而中和剂组大鼠在给药不同时间后血清中 ALT、AST 含量与空白组比较差异无统计学意义(P>0.05), 结果见表 1。

表 1 各组大鼠血清中 ALT、AST 含量检测结果( $\bar{x} \pm s$ , n=8, U/L)

Tab 1 Content determination of ALT and AST in serum of rats in each group( $\bar{x} \pm s$ , n=8, U/L)

组别	给药 1 周		给药 2 周		给药 3 周	
	ALT	AST	ALT	AST	ALT	AST
空白组	29.68 ± 4.86	90.70 ± 15.80	33.71 ± 8.16	92.67 ± 8.35	35.73 ± 4.47	100.50 ± 10.10
雷公藤组	33.83 ± 5.15	110.12 ± 25.71	49.85 ± 5.36*	140.59 ± 28.55**	63.47 ± 7.47***	206.56 ± 27.22***
中和剂组	31.63 ± 3.12	98.86 ± 16.08	44.73 ± 3.50	126.35 ± 26.80	42.50 ± 6.61	132.41 ± 16.18

注: 与空白组比较, \*P<0.05, \*\*P<0.01; 与中和剂组比较, #P<0.05, ##P<0.01

Note: vs. blank group, \*P<0.05, \*\*P<0.01; vs. neutralizer group, #P<0.05, ##P<0.01

### 3.2 血清中炎症因子检测结果

与空白组比较, 雷公藤组大鼠血清中 HMGB1、IL-1β、IL-2、TNF-α 水平均显著升高(P<0.01), 且显著高于中和剂组(P<0.05 或 P<0.01), 结果见表 2。

### 3.3 肝组织病理学观察结果

空白组大鼠肝组织结构清晰完好。雷公藤组大鼠肝组织中央静脉周围肝细胞水肿, 细胞肿胀、淡染(如黑色箭头所示); 血管内皮疏松, 内皮轻度增生(如灰色箭头所示); 肝细胞索结构清晰, 肝窦轻度扩张, 部分肝细胞胞浆内可见圆形空泡(如白色箭头所示)。中和剂组大鼠肝组织汇管区可见细胞增生及单核细胞浸润(如黑色箭头所示); 肝细胞索结构尚清晰, 少量肝细胞胞浆内可见大小不一的圆形空泡(如白色箭头所示), 病理切片

图见图 1。

表 2 各组大鼠血清中 HMGB1、IL-1β、IL-2、TNF-α 水平检测结果( $\bar{x} \pm s$ , n=8, pg/mL)

Tab 2 Serum levels of HMGB1, IL-1 β, IL-2 and TNF-α of rats in each group( $\bar{x} \pm s$ , n=8, pg/mL)

组别	HMGB1	IL-1β	IL-2	TNF-α
空白组	622.90 ± 29.91	145.66 ± 18.17	74.16 ± 1.70	14.32 ± 0.35
雷公藤组	752.38 ± 16.07***	186.42 ± 12.50***	85.01 ± 4.96**	17.19 ± 1.00***
中和剂组	646.72 ± 31.65	158.61 ± 12.13	74.51 ± 0.36	15.97 ± 0.24

注: 与空白组比较, \*P<0.05, \*\*P<0.01; 与中和剂组比较, #P<0.05, ##P<0.01

Note: vs. blank group, \*P<0.05, \*\*P<0.01; vs. neutralizer group, #P<0.05, ##P<0.01

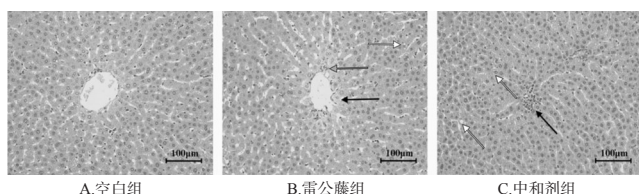


图 1 各组大鼠肝组织病理学观察切片图(x200)

Fig 1 Pathological observation of liver tissue of rats in each group(x200)

### 3.4 肝组织中 HMGB1、NF-κB p65、TLR4 蛋白表达水平检测结果

与空白组比较, 雷公藤组大鼠肝组织中 HMGB1、NF-κB p65、TLR4 蛋白表达水平显著升高(P<0.01), 且高于中和剂组(P<0.05 或 P<0.01), 蛋白测定电泳图见图 2, 蛋白表达水平测定结果见表 3。

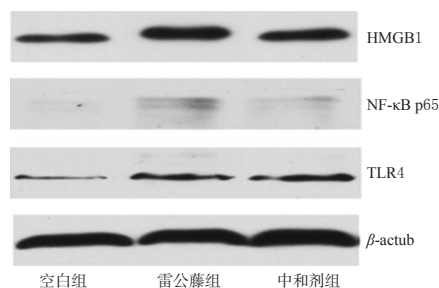


图 2 各组大鼠肝组织中 HMGB1、NF-κB p65、TLR4 蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophorograms of protein expression of HMGB1, NF-κB p65 and TLR4 in liver tissue of rats in each group

## 4 讨论

ALT、AST 是评价肝脏功能及肝脏损伤的常见检测指标<sup>[15]</sup>; 而 IL-1β、IL-2、TNF-α 为炎症反应的敏感指标, 特别是 TNF-α 在免疫炎症反应中占有重要地位<sup>[13, 16]</sup>。本研究结果显示, 加入雷公藤后大鼠血清中 ALT、AST 含量及炎症因子 IL-1β、IL-2、TNF-α 水平显著升高, 再结合病理学观察结果分析, 可见本研究成功复制了雷公藤致肝损伤大鼠模型。

表3 各组大鼠肝组织中HMGB1、NF-κB p65、TLR4蛋白表达检测结果( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab 3 Protein expression of HMGB1, NF-κ B p65 and TLR4 in liver tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	HMGB1/ $\beta$ -actin	NF-κ B p65/ $\beta$ -actin	TLR4/ $\beta$ -actin
空白组	0.46±0.03	0.27±0.03	0.19±0.05
雷公藤组	0.72±0.02***	0.53±0.03***	0.55±0.04***
中和剂组	0.48±0.05	0.40±0.01*	0.41±0.06*

注:与空白组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与中和剂组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

Note: vs. blank group,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ; vs. neutralizer group,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

HMGB1-TLR4/NF-κB炎症通路在诸多炎症反应中占据重要地位, HMGB1与TLR4受体结合后形成内或外源性复合物,再结合NF-κB进入细胞核,引起下游炎症因子(如IL-2、IL-6等)的产生,这些炎症因子进一步导致细胞损伤后释放HMGB1,形成炎症正反馈调节,引起炎症反应级联化扩大,加重炎症反应。与雷公藤组比较,中和剂组大鼠肝组织中HMGB1、NF-κB p65、TLR4蛋白表达水平及血清中HMGB1水平均显著降低,提示甘草酸铵成功地抑制了HMGB1生成,进而抑制了HMGB1-TLR4/NF-κB通路的激活。且在此炎症通路的激活被抑制后,AST、ALT和血清炎症因子IL-1 $\beta$ 、IL-2、TNF- $\alpha$ 的水平均降低,肝组织HE染色结果亦显示肝损伤程度减轻。可见,抑制HMGB1-TLR4/NF-κB炎症通路后肝组织炎症反应及损伤确实减轻,提示HMGB1-TLR4/NF-κB炎症通路极有可能是雷公藤致大鼠肝损伤的关键炎症通路。但是中和剂组大鼠炎症反应虽然减轻,但并未达到与空白组相同的水平,并且肝组织中TLR4、NF-κB p65蛋白表达水平较空白组显著升高( $P<0.05$ ),这提示可能还有其他原因激活了TLR4/NF-κB炎症通路,即还可能存在着其他能够与TLR4受体结合且引起肝损伤炎症通路的蛋白,具体原因还需要进一步探索。

综上所述,本研究证实了HMGB1-TLR4/NF-κB炎症通路在雷公藤致大鼠肝损伤中的作用,这为有针对性的雷公藤减毒研究提供了方向与思路。

### 参考文献

[1] 刘泽洲.菟丝子醇提物-雷公藤多苷配伍降低大鼠肝毒性的实验研究[D].北京:北京中医药大学,2015.  
[2] BAO J, DAI SM. A Chinese herb Tripterygium wilfordii Hook F in the treatment of rheumatoid arthritis: mecha-

nism, efficacy, and safety[J]. *Rheumatol Int*, 2011, 31(9):1123-1129.

[3] JIANG M, ZHA Q, ZHANG C, et al. Predicting and verifying outcome of Tripterygium wilfordii Hook F. based therapy in rheumatoid arthritis: from open to double-blind randomized trial[J]. *Sci Rep*, 2015.DOI: 10.1038/srep09700.  
[4] 张鑫.雷公藤制剂毒副作用及减毒方法研究进展[J].中国药理学杂志,2013,48(22):1897-1901.  
[5] 余递铎,何东初,张勇.雷公藤的毒性及减毒增效方法的研究进展[J].医学综述,2015,21(3):502-504.  
[6] 张倩,彭广操,朱明军.雷公藤的药理作用及毒性研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志,2016,14(15):1753-1754.  
[7] 吴霞,王忠震,林兵,等.雷公藤毒性作用机制研究[J].中国医院药学杂志,2015,35(16):1519-1523.  
[8] 赵小梅,浦仕彪,赵庆国,等.基于谱-效相关分析的雷公藤致肝毒性物质基础的初步研究[J].中国中药杂志,2016,41(15):2915-2921.  
[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):119-124.  
[10] 软丹部,周毅骏,张绍珠,等.雷公藤多苷抗巨噬细胞炎症及对TLR4/NF-κB调控炎症作用的研究[J].中国中药杂志,2015,40(16):3256-3261.  
[11] HAYAKA K, LIU J, LO EH. Biphasic action of HMGB1 signaling in inflammation and recovery after stroke[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010.DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05728.x.  
[12] 欧阳军,彭心宇,李峰.晚期炎症介质-高迁移率族蛋白B-1[J].现代生物医学进展,2010,10(5):968-971.  
[13] 黄继英,韩冰,张顺才,等.甘草酸铵通过抑制HMGB1的表达减轻ConA诱导的免疫性肝损伤[J].胃肠病学和肝病杂志,2012,2(13):264-267.  
[14] 仇君,何荣芬,高亮.茵栀黄口服液在免疫性肝损伤中的作用研究[J].中国药房,2010,21(27):2510-2512.  
[15] 林伟华,陈华英. ALT、AST、GGT、CHE在肝病中的诊断价值[J].现代临床医学生物工程杂志,2015,11(3):232-233.  
[16] 乐海浪,罗国强.创伤后早期炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6的研究进展[J].现代诊断与治疗,2014,25(4):763-765.

(收稿日期:2017-09-25 修回日期:2017-11-30)

(编辑:林静)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊,欢迎投稿、订阅