

# 藏红花素对雷公藤甲素致小鼠脏器损伤的保护作用研究<sup>△</sup>

严银银<sup>1,2\*</sup>, 闫敏<sup>2</sup>, 武香香<sup>2</sup>, 朱鑫<sup>3</sup>, 石文博<sup>1,2</sup>, 江梦园<sup>2</sup>, 曾华辉<sup>1,2#</sup>(1.河南中医药大学医学院, 郑州 450046; 2.河南中医药大学中医药科学院, 郑州 450046; 3.河南中医药大学药学院, 郑州 450046)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)19-2320-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.19.03



**摘要** 目的:研究藏红花素(CR)对雷公藤甲素(TP)致小鼠脏器损伤的保护作用,为TP配伍减毒研究提供参考。方法:将50只小鼠按体质量随机分为正常组,TP低、高剂量组(分别记为“TP-L组”“TP-H组”,300、600 μg/kg),TP低、高剂量与CR联用组(分别记为“TP-L+CR组”“TP-H+CR组”,300 μg/kg TP+100 mg/kg CR、600 μg/kg TP+100 mg/kg CR),每组10只。除正常组外,其余各组小鼠均灌胃相应药物,每天1次,连续7 d。每天称定小鼠体质量,并记录其死亡情况。末次灌胃后,处死小鼠,取其心脏、肝、肾、睾丸并计算脏器指数;测定其血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、尿素氮(BUN)、血肌酐(Scr)水平以及肝组织中总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性和丙二醛(MDA)含量;观察其心脏、肝、肾、睾丸组织的病理学变化;测定其肝组织中B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、胱天蛋白酶3(caspase-3) mRNA的相对表达量。结果:TP-L组、TP-H组、TP-L+CR组、TP-H+CR组分别有3、5、2、3只小鼠死亡,存活率分别为70%、50%、80%、70%。与正常组比较,TP-L组、TP-H组小鼠体质量(实验第7天)、心脏指数、肝指数、肾指数(TP-L组除外)睾丸指数和肝组织中T-SOD活性、Bcl-2 mRNA的相对表达量,血清中ALT(TP-L组除外)、AST(TP-L组除外)、BUN、Scr水平和肝组织中MDA含量、Bax mRNA的相对表达量、caspase-3 mRNA的相对表达量均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );心脏、肝、肾、睾丸组织均出现了明显的病理学变化。与同剂量TP单用组比较,TP与CR联用组小鼠上述指标均不同程度地改善,除TP-L+CR组小鼠的肾指数和血清中ALT水平外,差异均有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );心脏、肝、肾、睾丸组织的病理损伤均明显改善。结论:CR可减轻TP诱导的小鼠心脏、肝、肾、睾丸的损伤,这可能与CR的抗氧化应激作用有关。

**关键词** 雷公藤甲素;藏红花素;配伍减毒;脏器损伤;氧化应激;小鼠

- [12] 肖仁桥,王宗军,钱丽.我国不同性质企业技术创新效率及其影响因素研究:基于两阶段价值链的视角[J].管理工程学报,2015,29(2):190-201.
- [13] 尹述颖,陈立泰.基于两阶段SFA模型的中国医药企业技术创新效率研究[J].软科学,2016,30(5):54-58.
- [14] 窦超,熊曦,陈光华,等.创新价值链视角下中小企业创新效率多维度研究:基于加法分解的两阶段DEA模型[J].科技进步与对策,2019,36(2):77-85.
- [15] 吴丹丹,席晓宇,徐怀伏.研发投入的滞后效应研究:基于医药制造业的分析[J].中国卫生事业管理,2018,35(11):830-833,861.
- [16] 张丹,周戈耀,田海玉,等.基于超效率DEA模型的西南地区上市药企研发贡献度研究[J].中国药房,2019,30(12):1585-1590.
- [17] 张根文,李双双,曾行运.基于价值链视角对技术创新效率两阶段分析:以节能环保上市公司为例[J].工业技术经济,2015,34(8):108-116.
- [18] 李韵婷,张日新.广东高校科研创新效率动态评价:高水平大学建设前后对比分析[J].科技管理研究,2020,40(4):120-126.
- [19] 王楚君,许治,陈丽玉.基于标杆管理的中国研究型大学科技成果转化效率评价:网络排序方法的运用[J].科研管理,2020,41(3):183-193.
- [20] 张娇,殷群.我国企业孵化器运行效率差异研究:基于DEA及聚类分析方法[J].科学与科学技术管理,2010,31(5):171-177.
- [21] 夏昉,崔严尹,李银清.中国中药上市企业运行效率研究[J].中国药事,2020,34(4):471-477.
- [22] 马原,杨练,段占祺,等.基于链式模型的省际卫生总费用健康效率研究[J].中国卫生经济,2019,38(9):55-59.
- [23] 何健,冯雪飞,袁红梅.基于专利数据的中药产学研协同创新演进研究[J].中草药,2018,49(1):256-261.

△ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.U1604185);2020年河南中医药大学科研苗圃工程项目(No.MP2020-13)

\* 硕士研究生。研究方向:中医药的转化。E-mail: yinfeng20141017@163.com

# 通信作者:副研究员,硕士生导师,博士。研究方向:中医药的转化。E-mail: hhzeng@hactcm.edu.cn

(收稿日期:2021-04-25 修回日期:2021-07-11)

(编辑:刘明伟)

## Study on Protective Effects of Crocin against Triptolide-induced Visceral Organ Injury in Mice

YAN Yinyin<sup>1, 2</sup>, YAN Min<sup>2</sup>, WU Xiangxiang<sup>2</sup>, ZHU Xin<sup>3</sup>, SHI Wenbo<sup>1, 2</sup>, JIANG Mengyuan<sup>2</sup>, ZENG Huahui<sup>1, 2</sup>  
(1. School of Medicine, Henan University of TCM, Zhengzhou 450046, China; 2. Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of TCM, Zhengzhou 450046, China; 3. School of Pharmacy, Henan University of TCM, Zhengzhou 450046, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To study the protective effects of crocin (CR) against triptolide (TP)-induced visceral organ injury in mice, and to provide reference for the studying TP compatibility and detoxification. **METHODS:** Fifty mice were randomly divided into normal group, TP low-dose and high-dose groups (i.e. TP-L group, TP-H group, with 300, 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), TP low-dose and high dose combined with CR groups (i.e. TP-L+CR group, TP-H+CR group, with 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  TP+100 mg/kg CR, 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  TP+100 mg/kg CR), with 10 mice in each group. Except for normal group, other groups were given relevant medicine intragastrically, once a day, for consecutive 7 d. The body weight of mice was weighted every day, and their death was recorded. After last administration, the mice were sacrificed, and the heart, liver, kidney and testis were taken, and the organ index was calculated; serum levels of ALT, AST, BUN and Scr, the activity of T-SOD and the contents of MDA were all determined. The pathological changes of heart, liver, kidney and testis were observed; mRNA expression of Bcl-2, Bax and caspase-3 in liver tissue were determined. **RESULTS:** Three, five, two and three mice in TP-L group, TP-H group, TP-L+CR group and TP-H+CR group died respectively, and the survival rates were 70%, 50%, 80% and 70%, respectively. Compared with normal group, the body weight (7th day of experiment), heart index, liver index, kidney index (except for TP-L group), testicular index, T-SOD activity and mRNA expression of Bcl-2 in liver tissue, serum levels of ALT (except for TP-L group), AST (except for TP-L group), BUN and Scr, MDA content and mRNA expression of Bax, mRNA expression of caspase-3 in liver tissue were increased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). There were obvious pathological changes in heart, liver, kidney and testis tissue. Compared with the same dose of TP alone group, the above indexes of TP combined with CR group were improved in varying degrees. Except for the renal index and serum ALT level of TP-L+CR group, there was statistical significance for all indexes ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); the pathological injuries of heart, liver, kidney and testis were significantly improved. **CONCLUSIONS:** CR can relieve the damage of heart, liver, kidney and testis induced by TP, which may be related to the antioxidant stress of CR.

**KEYWORDS** Triptolide; Crocin; Compatibility attenuation; Organ damage; Oxidative stress; Mice

雷公藤甲素(triptolide, TP)是从雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f.中提取得到的一种环氧化二萜内酯化合物,其生物活性强、药效明确,可用于治疗系统性红斑狼疮、风湿性关节炎、肾病综合征及多种肿瘤疾病<sup>[1]</sup>。但由于TP水溶性差、体内消除快<sup>[1-2]</sup>,且毒副作用较大,可通过诱导氧化应激、细胞自噬和激活炎症及凋亡信号通路等对机体脏器(主要是肝<sup>[3]</sup>、肾<sup>[4]</sup>、心脏<sup>[5]</sup>、睾丸<sup>[6]</sup>等)产生毒性,故其临床应用受到了极大限制。藏红花素(crocin, CR)又称西红花苷,是从茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis果实中提取的一种多组分混合物。研究表明,CR具有抗癌、抗凋亡、抗炎和抗氧化等作用<sup>[7-8]</sup>。此外,有研究报道,CR可通过其独特的抗氧化活性降低应激状态下机体的氧化应激反应,从而起到保护肝、肾、心脏和睾丸的作用<sup>[9-10]</sup>。中药配伍减毒是一种普遍且有效的减毒策略<sup>[11]</sup>,本课题组前期对近年来与TP配伍减毒的相关药物进行整合归纳,尚未发现有CR与TP配伍减毒的研究报道。鉴于此,本研究拟考察具有抗氧化活性的CR与TP配伍给药后对小鼠脏器病理损伤、生化及氧化应激等指标的影响,探讨CR对TP诱导脏器损伤的保护作用,为TP配伍减毒研究提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括AL204型精密电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]、JA5001型电子天平(上海浦春计量仪器有限公司)、Microfuge 22R型微量台式冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司)、PHW-165Q型恒温培养箱(中科生命科技股份有限公司)、1510-02820C型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、KZ-III-F型高速低温组织研磨仪(武汉塞维尔生物科技有限公司)、BX61型荧光显微镜及成像系统(日本 Olympus 公司)、HWS-24型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司)、7500 Fast型实时荧光定量-聚合酶链式反应(PCR)仪(美国 ABI 公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

TP(批号HX190617010,纯度99.5%)购自西安昊轩生物科技有限公司;CR(批号QE4EB-LL,规格25 g)购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司;二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(批号WB6501)购自苏州新赛美生物科技有限公司;丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶

(AST)、尿素氮(BUN)、血肌酐(Scr)检测试剂盒(批号分别为20201031、20201026、20201202、20201202、20201120、20201204)均购自南京建成生物工程研究所;TriQuick Reagent总RNA提取试剂(批号20200924)购自北京索莱宝生物科技有限公司;Beyo RT™ III cDNA第一链合成试剂盒(批号093019201105)购自上海碧云天生物技术有限公司;Power Up™ SYBR™ Green Master Mix 荧光定量PCR双链DNA扩增试剂盒(批号00918736)购自美国Thermo Fisher Scientific公司;0.9%氯化钠注射液(批号5B20100704,规格250 mL:2.25 g)购自山东齐都药业有限公司;4%多聚甲醛溶液、睾丸固定液(批号分别为70085400、HJ200104)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为纯净水。

### 1.3 动物

本研究所用动物为SPF级KM小鼠,共50只,雄性,体质量为(20±2)g,购自郑州市惠济区华兴实验动物养殖场,动物生产许可证号为SCXK(豫)2019-0002。小鼠购入后,饲养于明暗交替(12 h/12 h)、温度(22±2)℃、相对湿度50%左右的环境中。本实验方案已通过河南中医药大学实验动物伦理委员会审核批准(编号DWLL202103173)。

## 2 方法

### 2.1 小鼠分组与给药

将50只雄性KM小鼠适应性饲养1周后按体质量随机分为5组,即正常组、TP低剂量组(记为“TP-L组”,300 μg/kg)、TP高剂量组(记为“TP-H组”,600 μg/kg)和TP低、高剂量与CR联用组(分别记为“TP-L+CR组”“TP-H+CR组”,300 μg/kg TP+100 mg/kg CR、600 μg/kg TP+100 mg/kg CR),每组10只。其中,TP剂量的设置参考文献[12]及前期预实验结果,CR剂量的设置参考文献[13]。各给药组小鼠均采用灌胃给药,给药体积均为20 μL/g,每天1次,连续7 d(首次给药天数记为实验第0天);正常组小鼠同法灌胃等体积生理盐水(即0.9%氯化钠注射液,下同)。每天早上9:00灌胃前称定小鼠体质量,并记录其死亡情况。

### 2.2 血清及组织样本的采集及处理

末次给药12 h后,所有小鼠均禁食不禁水12 h,称定其体质量后,摘眼球取血。血样先在室温下静置1 h,然后在4℃下以3 000 r/min离心15 min,分离上层血清。取血后,立即用颈椎脱臼法处死小鼠,打开其腹腔,于冰台上迅速取出其心脏、肝、肾和睾丸组织,用预冷的生理盐水冲洗掉组织上的血渍,并用滤纸吸取多余水分,然后称定各脏器的质量。取肝组织适量,剪碎后放于冻存管中,经液氮速冻后置于-80℃冰箱中保存。将

上述心脏、肾和剩余肝组织置于4%多聚甲醛溶液中固定,将睾丸用睾丸固定液固定,备用。

### 2.3 脏器指数的计算

根据各组小鼠心脏、肝、肾、睾丸组织的质量以及其体质量计算脏器指数:脏器指数=脏器质量(g)/小鼠体质量(g)×100%。

### 2.4 血清中生化指标水平检测

采用微板法检测小鼠血清中ALT、AST水平,采用比色法检测小鼠血清中BUN水平,采用肌氨酸氧化酶法检测小鼠血清中Scr水平。各指标检测均严格按照相应试剂盒说明书操作,均使用酶标仪检测。

### 2.5 肝组织中T-SOD活性和MDA含量检测

取“2.2”项下冻存的肝组织适量,称定质量,加入预冷的生理盐水[组织(g)与生理盐水(mL)的比例为1:9],用高速低温组织研磨仪研磨成10%的肝组织匀浆。吸取上述肝组织匀浆适量,用生理盐水稀释成1%的肝匀浆,待用。用BCA法分别计算出10%肝组织匀浆和1%肝组织匀浆中蛋白的含量后,分别采用WST-1法和硫代巴比妥酸(TBA)法检测肝组织中T-SOD活性和MDA含量。各指标检测均严格按照相应试剂盒说明书操作,均使用酶标仪检测。

### 2.6 心脏、肝、肾和睾丸组织的病理形态学观察

取“2.2”项下经固定的心脏、肝、肾和睾丸组织各适量,常规制备石蜡切片(厚度为3 μm)后,行苏木精-伊红(HE)染色,再经常规乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性树脂封片后,使用显微镜观察各组小鼠心脏、肝、肾和睾丸组织的病理形态学变化。

### 2.7 肝组织中B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、胱天蛋白酶3(caspase-3)mRNA表达水平测定

取“2.2”项下冻存肝组织适量,用TriQuick Reagent总RNA提取试剂[组织(mg)与提取试剂(mL)的比例为100:1]提取其总RNA,再对RNA进行浓度和纯度检测后,按Beyo RT™ III cDNA第一链合成试剂盒说明书操作,将RNA逆转录成cDNA。以cDNA为模板,使用实时荧光定量-PCR仪进行扩增。反应体系(10 μL)包括:cDNA模板4 μL,Power Up™ SYBR™ Green Master Mix试剂5 μL,上、下游引物各0.5 μL。反应条件为:50℃加热2 min,95℃预变性2 min;95℃变性15 s,60℃退火1 min,72℃延伸30 s,共40个循环。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参,采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法分析Bcl-2、Bax、caspase-3 mRNA的表达水平,并以正常组为参照计算其余各组mRNA的相对表达量。每组随机选取3只小鼠的样本进行测定,实验重复3次。基因引物由苏州金唯智生物科技有限公司设计并合成,引物序列及产物片段长度见表1。

表1 基因引物序列及产物长度

Tab 1 Primer sequence and product length of related gene

基因	引物序列(5'→3')	产物长度, bp
<i>Bcl-2</i>	上游: ATGCCTTTGTGGAACATATATGGC 下游: GGTATGCACCCAGAGTGATGC	120
<i>Bax</i>	上游: TGAAGACAGGGCCCTTTTGG 下游: AATTGCGCCGAGACTCG	140
<i>caspase-3</i>	上游: TGGTGATGAAGGGGTCATTATG 下游: TTCGGCTTCCAGTCAGACTC	105
<i>GAPDH</i>	上游: AGTCGGTGTGAACGGATTG 下游: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	123

2.8 统计学方法

采用SPSS 21.0软件对数据进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

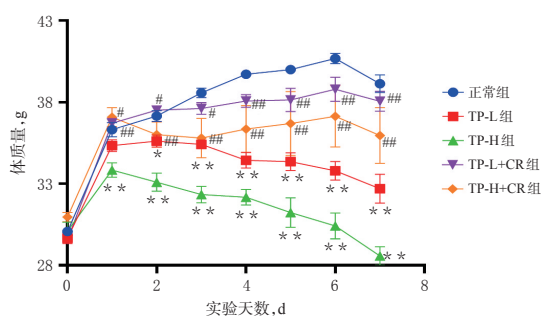
3 结果

3.1 TP与CR联用对小鼠存活率的影响

正常组小鼠在给药期间无死亡;TP-L组、TP-H组小鼠给药后分别有3、5只死亡,存活率分别为70%、50%;TP-L+CR组、TP-H+CR组小鼠给药后分别有2、3只死亡,存活率分别为80%、70%。可见,相较于同剂量TP单用组,TP与CR联用组小鼠的存活率均有一定提高。由于各给药组均有小鼠死亡,故后续实验中每组均选取5只小鼠的结果进行统计分析。

3.2 TP与CR联用对小鼠体质量的影响

从给药第2天起(即实验第1天),与正常组比较,TP-L、TP-H组小鼠的体质量均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );与同剂量TP单用组比较,TP与CR联用组小鼠的体质量均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。各组小鼠的体质量测定结果见图1。



注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与同剂量TP单用组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$

Note: vs. normal group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; vs. TP alone group of same dose, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$

图1 各组小鼠的体质量测定结果( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Fig 1 Body weight of mice in each group( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

3.3 TP与CR联用对小鼠脏器指数的影响

与正常组比较,TP-L、TP-H组小鼠的心脏、肝、睾丸指数以及TP-H组小鼠的肾指数均显著降低( $P<0.05$ 或

$P<0.01$ );与同剂量TP单用组比较,TP与CR联用组小鼠的上述各脏器指数均不同程度地升高,除TP-L+CR组小鼠的肾指数外,差异均有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。各组小鼠的心脏、肝、肾和睾丸指数测定结果见表2。

表2 各组小鼠的心脏、肝、肾和睾丸指数测定结果( $\bar{x} \pm s, n=5, \%$ )

Tab 2 Heart index, liver index, kidney index and testis index of mice in each group( $\bar{x} \pm s, n=5, \%$ )

组别	心脏指数	肝指数	肾指数	睾丸指数
正常组	0.667±0.016	5.338±0.080	1.523±0.102	0.592±0.026
TP-L组	0.573±0.012**	5.164±0.074*	1.470±0.076	0.539±0.010**
TP-H组	0.525±0.049**	4.903±0.239**	1.353±0.089*	0.502±0.032**
TP-L+CR组	0.665±0.035##	5.331±0.108#	1.515±0.052	0.583±0.010#
TP-H+CR组	0.663±0.074##	5.311±0.156#	1.500±0.049#	0.580±0.052##

注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与同剂量TP单用组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$

Note: vs. normal group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; vs. TP alone group of same dose, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$

3.4 TP与CR联用对小鼠血清中生化指标水平的影响

与正常组比较,TP-L组小鼠血清中BUN、Scr水平和TP-H组小鼠血清中AST、ALT、BUN、Scr水平均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。与同剂量TP单用组比较,TP与CR联用组小鼠血清中AST、ALT、BUN、Scr水平均不同程度降低,除TP-L+CR组小鼠血清中ALT水平外,差异均有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。各组小鼠血清中AST、ALT、BUN、Scr水平测定结果见表3。

表3 各组小鼠血清中AST、ALT、BUN、Scr水平测定结果( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab 3 Serum levels of AST, ALT, BUN and Scr of mice in each group( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	ALT, U/L	AST, U/L	BUN, mmol/L	Scr, $\mu$ mol/L
正常组	34.42±16.51	45.22±10.27	4.96±0.71	14.44±4.31
TP-L组	49.07±19.17	54.12±14.37	6.48±1.24*	20.88±3.24**
TP-H组	65.58±18.03**	66.29±16.42**	6.42±0.74*	23.59±1.13**
TP-L+CR组	30.46±7.16	36.18±9.56#	4.86±0.96#	15.60±3.77#
TP-H+CR组	25.28±5.26##	39.18±6.62##	5.19±0.94#	14.89±3.71##

注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与同剂量TP单用组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$

Note: vs. normal group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; vs. TP alone group of same dose, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$

3.5 TP与CR联用对小鼠肝组织中T-SOD活性和MDA含量的影响

与正常组比较,TP-L、TP-H组小鼠肝组织中T-SOD活性均显著降低( $P<0.01$ ),MDA含量均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。与同剂量TP单用组比较,TP与CR联用组小鼠肝组织中T-SOD活性均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),MDA含量均显著降低( $P<0.05$ )。各组小鼠肝组织中T-SOD活性和MDA含量测定结果见表4。

表4 各组小鼠肝组织中T-SOD活性和MDA含量测定结果( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab 4 T-SOD activity and MDA content in liver tissues of mice in each group( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	T-SOD,U/mg prot	MDA,nmol/mg prot
正常组	182.01 ± 13.15	3.67 ± 0.18
TP-L组	154.91 ± 11.11**	3.93 ± 0.13*
TP-H组	152.51 ± 10.62**	4.04 ± 0.18**
TP-L+CR组	183.09 ± 15.03 <sup>##</sup>	3.65 ± 0.15 <sup>#</sup>
TP-H+CR组	170.85 ± 8.56 <sup>#</sup>	3.77 ± 0.17 <sup>#</sup>

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与同剂量TP单用组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$

Note: vs. normal group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; vs. TP alone group of same dose, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$

### 3.6 TP与CR联用对小鼠心脏、肝、肾和睾丸组织病理形态学的影响

3.6.1 心脏组织 正常组小鼠心肌细胞形态正常,心肌纤维排列良好、横纹清晰;TP单用组小鼠心肌纤维均排列紊乱、横纹模糊不清,且TP-H组小鼠心脏组织间质内少量血管出现充血现象;TP与CR联用组小鼠的心肌细胞病理变化均较TP单用组明显改善,心肌纤维排列均良好、横纹均清晰,间质均未见充血现象。各组小鼠心脏组织病理形态学显微图见图2。

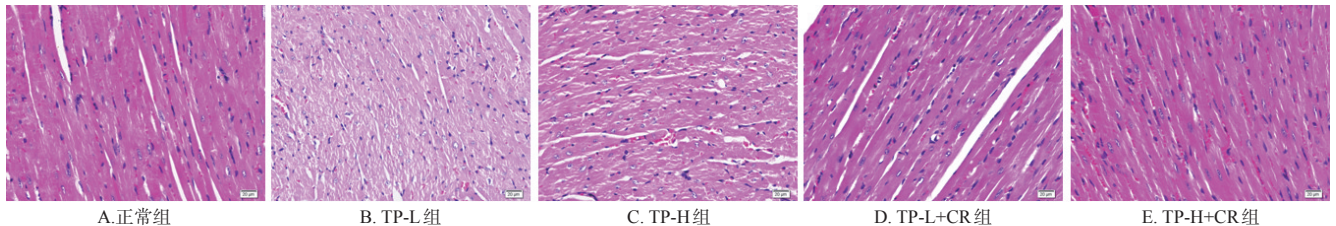


图2 各组小鼠心脏组织病理形态学显微图(HE染色,×400)

Fig 2 Pathomorphological micrograph of heart tissue of mice in each group(HE staining, ×400)

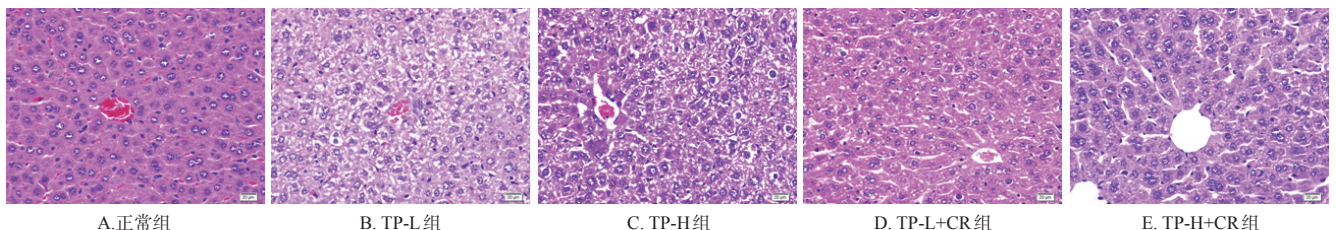


图3 各组小鼠肝组织病理形态学显微图(HE染色,×400)

Fig 3 Pathomorphological micrograph of liver tissue of mice in each group(HE staining, ×400)

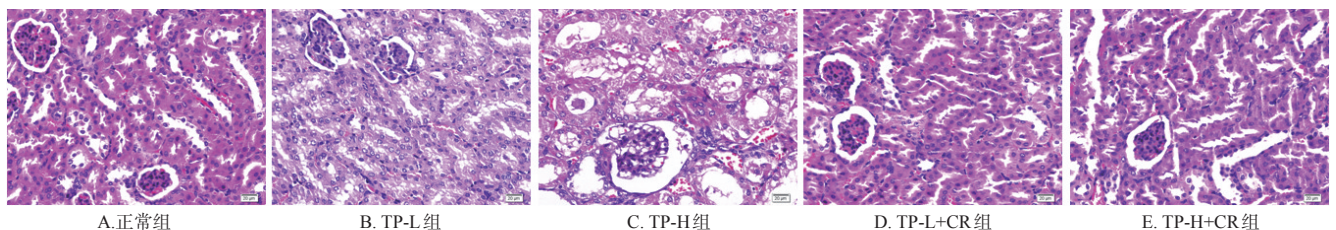


图4 各组小鼠肾组织病理形态学显微图(HE染色,×400)

Fig 4 Pathomorphological micrograph of kidney tissue of mice in each group(HE staining, ×400)

3.6.2 肝组织 正常组小鼠肝细胞无水肿,肝索排列整齐,肝小叶结构清晰;TP单用组小鼠肝细胞均可见严重水肿、炎性细胞浸润、溶解性坏死等病理学变化;TP与CR联用组小鼠的肝细胞均无水肿、无炎性细胞浸润,形态均接近正常。各组小鼠肝组织病理形态学显微图见图3。

3.6.3 肾组织 正常组小鼠肾小球结构完整,组织形态正常;TP-L组小鼠肾小管上皮细胞略肿胀,偶见炎性细胞浸润;TP-H组小鼠肾组织出现血栓,肾小球萎缩,间质内纤维组织弥漫性增多;TP与CR联用组小鼠肾小球结构均较TP单用组明显改善、纤维组织均减少,均未见血栓,且肾组织形态均接近正常。各组小鼠肾组织病理形态学显微图见图4。

3.6.4 睾丸组织 正常组小鼠睾丸形态正常,各级生精细胞发育良好、排列规则,腔内可见大量的成熟精子;TP-L组小鼠睾丸中成熟精子数量明显减少,少量生精细胞脱离基底面;TP-H组小鼠睾丸组织基底面细胞发生空泡变性、层次变窄,各级生精细胞排列不规则,腔内无成熟精子;TP与CR联用组小鼠睾丸组织基底面细胞层次较TP单用组增厚、排列规则,成熟精子数量明显增多。各组小鼠睾丸组织病理形态学显微图见图5。

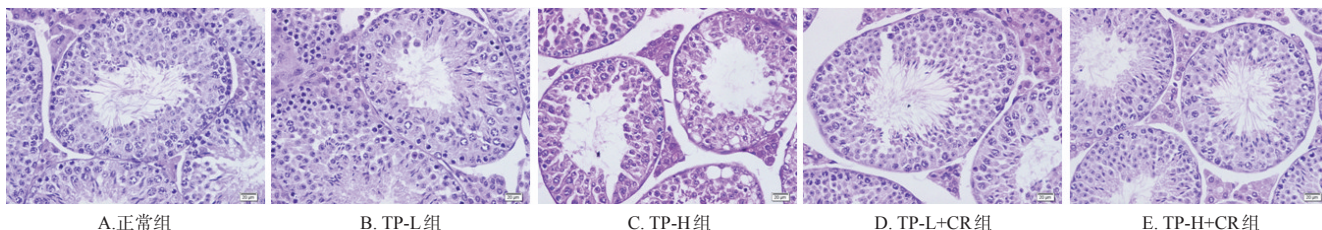


图5 各组小鼠睾丸组织病理形态学显微图(HE染色,×400)

Fig 5 Pathomorphological micrograph of testis tissue of mice in each group(HE staining, ×400)

### 3.7 TP与CR联用对小鼠肝组织中Bcl-2、Bax、caspase-3 mRNA表达的影响

与正常组比较, TP-L、TP-H组小鼠肝组织中Bax、caspase-3 mRNA的相对表达量均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), Bcl-2 mRNA的相对表达量均显著降低( $P < 0.01$ )。与同剂量TP单用组比较, TP与CR联用组小鼠肝组织中Bax、caspase-3 mRNA的相对表达量均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), Bcl-2 mRNA的相对表达量均显著升高( $P < 0.01$ )。各组小鼠肝组织中Bcl-2、Bax、caspase-3 mRNA的相对表达量测定结果见表5。

表5 各组小鼠肝组织中Bcl-2、Bax、caspase-3 mRNA的相对表达量测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 5 mRNA expression of Bcl-2, Bax and caspase-3 in liver tissue of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	Bcl-2	Bax	caspase-3
正常组	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.03
TP-L组	0.62 ± 0.03**	1.39 ± 0.11*	1.44 ± 0.17**
TP-H组	0.53 ± 0.04**	2.94 ± 0.19**	2.00 ± 0.10**
TP-L+CR组	1.02 ± 0.08 <sup>##</sup>	0.79 ± 0.01 <sup>##</sup>	1.08 ± 0.12 <sup>#</sup>
TP-H+CR组	0.76 ± 0.08 <sup>##</sup>	0.76 ± 0.05 <sup>##</sup>	1.16 ± 0.08 <sup>##</sup>

注:与正常组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与同剂量TP单用组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$

Note: vs. normal group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; vs. same dose of TP alone group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$

## 4 讨论

存活率和体质量均是毒性实验中比较直观的检测指标。本研究结果显示,与正常组比较,TP单用组小鼠死亡数量较多,且其体质量均显著下降;而与同剂量TP单用组比较,TP与CR联用组小鼠的死亡数量相对较少,且其体质量均显著升高,这表明CR可改善TP诱导的小鼠体质量下降及死亡。脏器指数是动物实验中用于检测药物毒性强度的常用指标,当脏器发生退行性萎缩以及充血或水肿等增大变化时,其脏器指数也会随即发生改变;脏器指数的变化不仅可反映出药物对脏器的综合毒性作用,还可为寻找毒性物质作用的靶器官提供重要线索<sup>[14]</sup>。通过组织病理形态学检查,可进一步验证毒性物质对脏器的损伤<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,与正常组比较,TP单用组小鼠心脏、肝、肾和睾丸指数均不同程度

地降低,表明TP可诱导小鼠脏器功能发生退行性改变或萎缩,综合毒性较强;而TP与CR联用组小鼠的上述脏器指数均较TP单用组不同程度地升高,表明CR可逆转TP诱导的小鼠脏器指数的改变。本研究病理形态学检查结果显示,TP对小鼠心脏、肝、肾和睾丸组织均有明显损伤,且剂量越高损伤越严重;而TP与CR联用组小鼠上述脏器组织的损伤均较TP单用组有明显改善,表明CR可减弱TP对小鼠脏器的毒性。

AST、ALT和BUN、Scr分别是反映肝、肾功能损伤最常用的检测指标,其水平越高,说明肝、肾功能损伤越严重<sup>[15-16]</sup>。本研究结果显示,TP单用组小鼠血清中AST、ALT、BUN、Scr水平均显著高于正常组,提示TP给药后小鼠肝、肾功能受损;与同剂量TP单用组比较,TP与CR联用组小鼠血清中AST、ALT、BUN、Scr水平均不同程度地降低,说明CR可以保护TP诱导的肝、肾功能损伤。T-SOD活性和MDA含量分别是直接和间接反映机体在氧化应激状态下抗氧化能力强弱的指标<sup>[17]</sup>。有研究表明,CR可以通过升高机体中T-SOD活性、降低机体中MDA含量,从而降低机体氧化应激反应,最终起到保护脏器的作用<sup>[12]</sup>。本研究结果显示,与正常组比较,TP单用组小鼠肝组织中T-SOD活性均显著降低,MDA含量均显著升高;与同剂量TP单用组比较,TP与CR联用组小鼠肝组织中T-SOD活性均显著升高,MDA含量均显著降低,这说明CR可以逆转TP诱导的小鼠肝脏的氧化应激损伤。

研究显示,TP可通过调控Bax基因的表达来激活caspase-3,进而触发细胞凋亡,最终产生脏器毒性<sup>[14]</sup>。Bcl-2能与Bax结合形成异源二聚体,阻止Bax的释放,从而抑制细胞凋亡;此外,Bcl-2过表达也可减少氧自由基的产生,进而抑制氧化应激反应<sup>[18]</sup>。氧化应激反应能够导致线粒体损伤,减少腺苷三磷酸的产生,进而促进细胞凋亡<sup>[19]</sup>。本研究结果显示,TP单用组小鼠肝组织中Bax、caspase-3 mRNA的相对表达量均显著升高,Bcl-2 mRNA的相对表达量均显著降低;而同剂量TP与CR联用组小鼠肝组织中Bax、caspase-3 mRNA的相对表达量均显著降低,Bcl-2 mRNA的相对表达量均显著升高。结果提示,当TP给药后机体发生氧化应激反应和细胞

凋亡时,CR可以减少由氧化应激诱导的细胞凋亡的发生。

综上所述,CR可减轻TP诱导的小鼠心脏、肝、肾、睾丸组织的损伤,这可能与CR的抗氧化应激作用有关。但TP所致毒副作用的机制十分复杂,本研究只是初步研究了CR对TP诱导脏器损伤的保护作用,还需开展更深入的机制研究来进一步验证。

### 参考文献

- [1] 张雪,彭富全,何风雷,等.含雷公藤甲素中药的风险控制[J].中成药,2019,41(7):1667-1671.
- [2] CAI B, HU Z, TANG H, et al. Triptolide impairs genome integrity by directly blocking the enzymatic activity of DNA-PKcs in human cells[J]. Biomed Pharmacother, 2020,129:110427.
- [3] HASNAT M, YUAN Z, ULLAH A, et al. Mitochondria-dependent apoptosis in triptolide-induced hepatotoxicity is associated with the Drp1 activation[J]. Toxicol Mech Methods, 2020,30(2):124-133.
- [4] XIE L J, ZHAO Y W, DUAN J G, et al. Integrated proteomics and metabolomics reveal the mechanism of nephrotoxicity induced by triptolide[J]. Chem Res Toxicol, 2020,33(7):1897-1906.
- [5] WANG S, CHEN X, LING S, et al. MicroRNA expression, targeting, release dynamics and early-warning biomarkers in acute cardiotoxicity induced by triptolide in rats[J]. Biomed Pharmacother, 2019,111:1467-1477.
- [6] 孟天琦,马宏博.雷公藤生殖毒性机制研究进展[J].中华中医药学刊,2020,38(3):196-198.
- [7] ZHU J, ZHENG S, LIU H, et al. Evaluation of anti-tumor effects of crocin on a novel 3D tissue-engineered tumor model based on sodium alginate/gelatin microbead[J]. Int J Biol Macromol, 2021,174:339-351.
- [8] TAHERI R, HADIPOUR E, TAYARANI-NAJARAN Z. Crocin protects against beta-amyloid peptide-induced apoptosis in PC12 cells via PI3K pathway[J/OL]. Curr Mol Pharmacol, 2020[2021-08-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33045973/>. DOI: 10.2174/187446721366620-1012160401.
- [9] HUSSAIN M A, ABOGRESHAN M, ABDELKADER G, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of crocin ameliorate doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021,2021:8841726.
- [10] MARD S A, AKBARI G, DIANAT M, et al. Protective effects of crocin and zinc sulfate on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats: a comparative experimental model study[J]. Biomed Pharmacother, 2017,96:48-55.
- [11] YARIJANI Z M, POURMOTABBED A, POURMOTABBED T, et al. Crocin has anti-inflammatory and protective effects in ischemia-reperfusion induced renal injuries[J]. Iran J Basic Med Sci, 2017,20(7):753-759.
- [12] DIANAT M, ESMAELIZADEH M, BADAVI M, et al. Protective effects of crocin on ischemia-reperfusion induced oxidative stress in comparison with vitamin E in isolated rat hearts[J]. Jundishapur J Nat Pharm Prod, 2014,69(2):e17187.
- [13] MIRZAEI S, BAYATPOOR M E, SHAHYAD S, et al. The protective effects of crocin on testopathy in fat-fed and streptozotocin-treated diabetic rats: an experimental study[J]. Int J Reprod Biomed, 2019,17(2):89-98.
- [14] 刘斌,樊丹平,舒海洋,等.雷公藤甲素毒性作用及减毒研究的整合探析[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(20):181-190.
- [15] WANG X, JIANG Z, XING M, et al. Interleukin-17 mediates triptolide-induced liver injury in mice[J]. Food Chem Toxicol, 2014,71:33-41.
- [16] 张立明.京尼平苷和藏红花素对四氯化碳急性肝中毒小鼠的保护作用研究[D].成都:中国科学院研究生院,2005.
- [17] 孙建新,安娟,连军.影响实验动物脏器重量及脏器系数因素分析[J].实验动物科学,2009,26(1):49-51.
- [18] 张杰,赵昂,鲍晓文,等.紫云英苷对雷公藤甲素所致小鼠睾丸损伤的保护作用[J].生物加工过程,2020,18(3):369-374.
- [19] 陈琪,周静威,孙满强,等.地黄水提取物减轻雷公藤甲素所致肝脏氧化应激损伤的实验研究[J].世界中西医结合杂志,2020,15(12):2241-2245,2251.

(收稿日期:2021-05-07 修回日期:2021-08-13)

(编辑:林静)

《中国药房》杂志——中文核心期刊,欢迎投稿、订阅