

细胞自噬在雷公藤肝毒性中的研究进展

周捷, 周学平*

南京中医药大学, 江苏 南京

收稿日期: 2021年10月5日; 录用日期: 2021年11月8日; 发布日期: 2021年11月15日

摘要

雷公藤是治疗风湿免疫病的常用药, 疗效显著, 但其毒副作用明显, 尤以肝毒性多见。因此雷公藤肝毒性的相关研究对临床安全用药意义重大, 已成为目前研究的热点与难点。细胞自噬是研究雷公藤肝毒性的新方向, 备受相关领域学者的关注。本文通过文献查阅, 从自噬的发生与调控机制、雷公藤肝毒性特点及物质基础、自噬与雷公藤肝毒性的关系等方面进行总结与归纳, 旨在明确目前细胞自噬在雷公藤肝毒性研究中的现状和不足, 为雷公藤肝毒性研究提供新的思路, 并为临床合理用药提供参考。

关键词

自噬, 雷公藤, 肝毒性

Research Progress of Hepatotoxicity Induced by *Tripterygium wilfordii* through Autophagy

Jie Zhou, Xueping Zhou*

Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing Jiangsu

Received: Oct. 5th, 2021; accepted: Nov. 8th, 2021; published: Nov. 15th, 2021

Abstract

Tripterygium wilfordii (TW) has been widely used in the treatment of rheumatic immune diseases with curative effect. However, it has severe toxicity and adverse reactions, especially the hepatotoxicity. Therefore, the related research on the hepatotoxicity of TW is of great significance to clinical safe drug use, and has become the focal and difficult point in the current research. Auto-

*通讯作者。

phagy is a new direction in the research of the hepatotoxicity of TW and has attracted the attention of scholars in related fields. Through literature review, this paper summarized the occurrence and regulation mechanism of autophagy, the characteristics and material basis of hepatotoxicity of TW, and the relationship between autophagy and the hepatotoxicity of TW. This paper clarified the current situation and deficiencies of autophagy in the research of hepatotoxicity of TW, so as to propose new research strategies and provide ideas for clinical rational drug use of TW.

Keywords

Autophagy, *Tripterygium wilfordii*, Hepatotoxicity

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

中药雷公藤为卫矛科植物雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook. f.)的干燥根部, 味苦、性寒, 有大毒, 功擅祛风除湿、活血通络、消肿止痛、杀虫解毒[1]。现代药理学研究表明: 雷公藤有良好的抗炎、免疫抑制、镇痛、抗生育、抗肿瘤活性[2], 临床常用于治疗类风湿关节炎、红斑狼疮、肾病、皮肤病等多种疾病。但随着雷公藤及其制剂的广泛使用, 其毒副作用也越来越受到关注。肝脏是药物代谢的主要场所, 也是重要的解毒器官。有统计表明雷公藤的毒副作用中肝毒性的发生率最高, 然其引发肝毒性的机制尚未明确[3]。

自噬(autophagy)是细胞自我降解的过程[4], 在饥饿及应激等条件下激活, 通过溶酶体清除细胞内错误折叠的蛋白质、受损或老化细胞器等以维持胞内稳态, 促进存活[5]。近年来的研究表明: 自噬与雷公藤的肝损伤机制密切相关, 调控自噬可能是减轻雷公藤肝毒性的新切入点[6]。本文就细胞自噬在雷公藤肝毒性研究中的相关进展综述如下。

2. 自噬的发生与调控

自噬过程受一系列自噬相关基因(autophagy-related gene, ATG)的精准调控, 自噬相关基因最早在酵母细胞中被确定, 其核心机制在哺乳动物中具有良好的保守性[7]。根据底物运送至溶酶体方式的不同, 自噬分为巨自噬(macropahgy)、微自噬(micropahgy)和分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA)。其中, 又以巨自噬的研究最为广泛与深入。

巨自噬过程有特征性的双层膜结构的自噬体参与, 自噬体包被胞质成分后与溶酶体融合形成自噬溶酶体并降解内含物[8]。自噬是一个连续的过程, 大致可分为前体结构的形成、双层膜的扩展、自噬体的形成、自噬溶酶体的形成以及新溶酶体的形成几个阶段[9]。起始步骤为前体结构形成并招募相关 ATG 蛋白和膜成分, 随后双层膜在多个 ATG 蛋白的调控下扩展、延伸, 逐渐包裹胞质组分形成密闭的球状结构, 即为自噬体。自噬体的外膜与溶酶体融合, 形成自噬溶酶体。内膜和内含物则被溶酶体酶降解为氨基酸、脂肪酸、核苷酸等小分子后运送到胞浆中, 供细胞重新利用。最终, 自噬溶酶体会再生形成新的溶酶体[10]。

3. 雷公藤肝毒性特点及物质基础

雷公藤制剂的药效成分同时又是其毒性成分且治疗窗较窄, 国家食品药品监督管理局曾发通报指出

2004年1月至2011年9月,雷公藤制剂共引起839例不良反应,其肝脏毒性主要表现为药物性肝炎[11]。临床多急性起病,杨涛等[12]检索分析了13例雷公藤导致肝损伤的临床报道,其中毒表现多样,以乏力、纳差、呕吐、尿黄、黄疸等症状最为常见,亦可见腹痛、腹泻、尿少、肢面水肿、胸闷、头晕及皮疹、发热等过敏反应。体格检查可见肝脏肿大和压痛,实验室检查见血清转氨酶升高、胆汁瘀积明显[13]。

目前从雷公藤中分离出的化学成分已达数百种,其肝毒性可能是其多种成分综合作用的结果。有研究表明雷公藤所含的生物碱类、二萜类、三萜类物质均有一定的毒性,其中二萜类成分毒性最大[14]。雷公藤甲素(triptolide)是雷公藤主要活性成分,具有明显的毒效相关性,也是雷公藤引起肝损伤的主要物质基础[15]。体内外实验表明,雷公藤甲素可以导致LO2细胞[16]及小鼠肝细胞明显损伤[17]。Wang等[18]每天以600 μ g/kg剂量的雷公藤甲素对雌性小鼠进行灌胃,分别持续1天、3天或5天,观察到随着雷公藤甲素的连续使用,小鼠谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)水平显著升高($P < 0.01$),肝损伤加重。其诱导的肝损伤以肝实质细胞损伤为主[19],具有剂量依赖性并且存在着性别差异[20]。此外,雷公藤中的生物碱类成分,主要包含雷公藤碱、雷公藤次碱、雷公藤宁碱等[21]以及三萜类成分雷公藤红素和去甲泽拉木(demethylzeylasteral)等也对雷公藤肝毒性贡献较大[22]。

4. 自噬与雷公藤肝毒性

4.1. 雷公藤诱导肝细胞自噬激活

在体外培养的HL7702细胞中,观察到雷公藤甲素提高了自噬相关蛋白Beclin1和LC3II的表达水平,促进了自噬小体的形成,诱导了肝细胞自噬激活[23]。雷公藤可能通过多途径诱导自噬,其中线粒体损伤及氧化应激处于核心环节[24]。雷公藤甲素会损害肝细胞线粒体的功能,引起活性氧(ROS)水平升高,降低抗氧化酶活性,导致肝细胞中的氧化应激[25]。Fu等[26]利用雷公藤甲素(0, 200, 400 μ g/kg)诱导雌性SD大鼠肝损伤模型,观察到肝细胞线粒体膜电位降低,ROS含量增加,GSH含量降低,推测雷公藤甲素的肝损伤机制与线粒体呼吸链抑制引起的氧化应激反应有关。Hasnat等[27]发现经雷公藤甲素(400 μ g/kg)处理后的Wistar大鼠,肝细胞中线粒体碎裂、功能障碍,同时线粒体自噬增强。线粒体自噬是细胞清除受损线粒体,缓解氧化损伤的主要途径[28]。

4.2. 自噬在雷公藤所致肝损伤中的作用

自噬这一现象最早在用胰高血糖素处理的小鼠肝脏细胞中被观察到[29],近年来大量研究也证实了自噬与肝脏疾病的发生发展关系密切[30]。生理条件下,肝细胞中存在着低水平的自噬[31]。而在病理状态下,自噬的激活可以特异性地清除受损的细胞器[32]、异常增多的ROS[33]等,减轻细胞损伤,维持肝细胞内的代谢平衡。

但同时自噬在肝损伤的发生发展过程中也扮演着重要的角色,细胞自噬也是细胞程序性死亡的形式之一。刘春晖等[34]以不同质量浓度的雷公藤甲素(0.0032, 0.016, 0.08, 0.4, 2 g/L)处理体外培养的HepG2细胞48 h,发现随着雷公藤甲素质量浓度的增加,HepG2细胞损伤程度加重,SOD、GSH-Px等抗氧化指标的活力下降,自噬相关蛋白LC3II与Beclin1表达增强。过氧化状态下细胞的自噬激活是细胞对抗过氧化损伤一种保护性反应[35],但雷公藤甲素浓度的增加可能引起了自噬的过度激活,造成胞质成分的过度降解,导致“自噬性细胞死亡”[36]。

此外,肝细胞凋亡也受到自噬活性的调节,两者间存在着复杂的相互联系[37]。通常在应激条件下,自噬先于凋亡激活,通过清除受损线粒体、促凋亡蛋白等凋亡的诱导因素,阻断凋亡通路,抑制凋亡水平。但另一方面,也有证据表明自噬的诱导促进了细胞凋亡的激活[38]。自噬与凋亡存在着相同的上游调

节信号, 包括 Bcl-2 家族、caspase 家族、ATGs 和 p53 等, 它们在自噬与凋亡两者间起到双重调控的作用 [38]。雷公藤甲素可以通过引起线粒体损伤, 促进细胞色素 C (cyt-c) 向胞质释放, 下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 水平, 同时上调促凋亡蛋白 Bax, 抑癌基因 p53 表达, 增加 caspase3 和 caspase9 活性, 诱导肝细胞凋亡 [39]。在雷公藤甲素诱导小鼠急性肝损伤的形态学研究中, 以雷公藤甲素 LD50 剂量(0.8 mg/kg)对小鼠灌胃, 在透射电镜下可见到肝细胞骨架结构异常、细胞器减少、自噬体明显增多。TUNEL 染色示小鼠肝组织中出现大量强阳性细胞核, 肝细胞凋亡明显。提示过度自噬诱导的细胞凋亡可能是雷公藤甲素诱导急性肝损伤的关键病理环节[40]。

因此, 雷公藤甲素诱导的肝细胞自噬可能在肝损伤的过程中起到了“双刃剑”的作用。损伤前期, 自噬作为一种防御机制, 抑制肝细胞凋亡, 并使肝细胞在雷公藤甲素诱导的氧化应激下存活。损伤后期, 自噬的过度激活导致了细胞器和细胞质的大量降解, 促进了肝细胞凋亡, 最终造成肝损伤。

5. 总结与展望

细胞自噬通过控制细胞器及代谢产物的周转以维持自身稳态, 但同时自噬也具有双面性, 自噬的过度激活可导致细胞死亡[41]。大量研究表明, 细胞自噬与雷公藤肝毒性机制密切相关。自噬在雷公藤所致肝损伤过程中也体现出了双面性的特征, 即随着自噬水平的升高, 自噬表现出由保护到损伤的转变趋势, 雷公藤肝毒性与其诱导的肝细胞自噬水平存在一定的相关性。但其与雷公藤给药时间、剂量等影响因素的关系仍有待深入研究。并且, 雷公藤诱导自噬过度激活造成肝损伤的具体机制尚未完全清楚。

此外, 调控制自噬可能是减轻雷公藤肝毒性的新策略。已有研究发现菟丝子乙醇提取物可以缓解雷公藤多苷片诱发的过度自噬, 减轻肝损伤[42]。

综上, 进一步探索细胞自噬与雷公藤肝毒性的关系是明确雷公藤肝损伤机制的新突破点, 有助于雷公藤相关的减毒研究及临床安全用药。

基金项目

国家自然科学基金(81973741)。

参考文献

- [1] 苏桂花, 苑述刚, 马少丹, 等. 雷公藤的本草学及临床应用研究[J]. 河南中医, 2011, 31(4): 412-414.
- [2] 马伟光, 张滔, 张超, 等. 有毒药物雷公藤的研究及展望[J]. 中华中医药杂志, 2006(2): 117-120.
- [3] 田雅格, 苏晓慧, 刘立玲, 等. 近 20 年来雷公藤肝毒性研究概述[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16): 3399-3405.
- [4] 王懿峥, 陈扬, 俞立. 自噬的前世今生[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2018, 34(3): 229-239.
- [5] Doherty, J. and Baehrecke, E.H. (2018) Life, Death and Autophagy. *Nature Cell Biology*, **20**, 1110-1117. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0201-5>
- [6] Wei, Y.-M., Wang, Y.-H., Xue, H.-Q., et al. (2019) Triptolide, A Potential Autophagy Modulator. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, **25**, 233-240. <https://doi.org/10.1007/s11655-018-2847-z>
- [7] Zhang, H. and Baehrecke, E.H. (2015) Eaten Alive: Novel Insights into Autophagy from Multicellular Model Systems. *Trends in Cell Biology*, **25**, 376-387. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.03.001>
- [8] Glick, D., Barth, S. and Macleod, K.F. (2010) Autophagy: Cellular and Molecular Mechanisms. *The Journal of Pathology*, **221**, 3-12. <https://doi.org/10.1002/path.2697>
- [9] 张宏, 张慧. 多细胞生物自噬的分子机制和生理功能[J]. 安徽大学学报(自然科学版), 2018, 42(5): 105-114.
- [10] 冯文之, 陈扬, 俞立. 细胞自噬分子机制的进展[J]. 生命科学, 2015, 27(7): 859-866.
- [11] 国家食品药品监督管理局提醒关注雷公藤制剂的用药安全[J]. 中国药房, 2012, 23(21): 2005.
- [12] 杨涛, 张亚蕾, 朱亭亭, 等. 雷公藤致肝损伤的临床特点与主要机制[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2018, 20(11): 2027-2032.

- [13] 柴智, 周文静, 高丽, 等. 雷公藤肝毒性及其作用机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 243-246.
- [14] 刘为萍, 刘素香, 唐慧珠, 等. 雷公藤研究新进展[J]. 中草药, 2010, 41(7): 1215-1218.
- [15] 贾歌刘畅, 庞晶瑶, 马致洁, 等. 雷公藤肝毒性化学成分、毒性机制及减毒方法研究进展[J]. 中国药房, 2016, 27(13): 1857-1861.
- [16] 周静, 张磊, 吴瑕, 等. 雷公藤甲素对 L-O2 细胞凋亡及 Caspase-3、ATPase、MMP、Ca²⁺的影响[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(6): 72-75.
- [17] 于淑静, 魏彩冰, 陶崑, 等. 雷公藤甲素致小鼠肝损伤的机制研究[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(3): 472-476.
- [18] Wang, X.-Z., Xue, R.-F., Zhang, S.-Y., *et al.* (2018) Activation of Natural Killer T Cells Contributes to Triptolide-Induced Liver Injury in Mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, **39**, 1847-1854. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0084-9>
- [19] 王贝, 江振洲, 张陆勇. 雷公藤甲素毒性及减毒的研究进展[J]. 药物评价研究, 2012, 35(3): 211-215.
- [20] Pan, Y., Cao, M., You, D., *et al.* (2019) Research Progress on the Animal Models of Drug-Induced Liver Injury: Current Status and Further Perspectives. *BioMed Research International*, **2019**, Article ID: 1283824. <https://doi.org/10.1155/2019/1283824>
- [21] 虞海燕, 秦万章. 雷公藤活性单体的筛选及毒性研究[J]. 浙江中医学院学报, 2000(2): 70-71+82.
- [22] 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.
- [23] Wei, Y.M., Luan, Z.H., Liu, B.W., *et al.* (2019) Autophagy in Triptolide-Mediated Cytotoxicity in Hepatic Cells. *International Journal of Toxicology*, **38**, 436-444. <https://doi.org/10.1177/1091581819864518>
- [24] Filomeni, G., De Zio, D. and Cecconi, F. (2015) Oxidative Stress and Autophagy: The Clash between Damage and Metabolic Needs. *Cell Death and Differentiation*, **22**, 377-388. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.150>
- [25] Fu, Q., Jiang, Z. and Zhang, L. (2013) Impairment of Triptolide on Liver Mitochondria in Isolated Liver Mitochondria and HL7702 Cell Line. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, **19**, 683-688. <https://doi.org/10.1007/s11655-012-1265-x>
- [26] Fu, Q., Huang, X., Shu, B., *et al.* (2011) Inhibition of Mitochondrial Respiratory Chain Is Involved in Triptolide-Induced Liver Injury. *Fitoterapia*, **82**, 1241-1248. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.08.019>
- [27] Hasnat, M., Yuan, Z., Naveed, M., *et al.* (2019) Drp1-Associated Mitochondrial Dysfunction and Mitochondrial Autophagy: A Novel Mechanism in Triptolide-Induced Hepatotoxicity. *Cell Biology and Toxicology*, **35**, 267-280. <https://doi.org/10.1007/s10565-018-9447-8>
- [28] 吴艳萍, 王阳, 李雅丽, 等. 氧化应激与自噬[J]. 动物营养学报, 2016, 28(9): 2673-2680.
- [29] Deter, R.L., Baudhuin, P. and De Duve, C. (1967) Participation of Lysosomes in Cellular Autophagy Induced in Rat Liver by Glucagon. *The Journal of Cell Biology*, **35**, C11-C16. <https://doi.org/10.1083/jcb.35.2.C11>
- [30] 黄慧, 李洪艳, 邹伟. 自噬在肝稳态调节作用中的研究进展[J]. 生物工程学报, 2016, 32(9): 1185-1193.
- [31] Cecconi, F. and Levine, B. (2008) The Role of Autophagy in Mammalian Development: Cell Makeover Rather than Cell Death. *Developmental Cell*, **15**, 344-357. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.08.012>
- [32] 郎秀娟, 王燕. PINK1/parkin 通路调控线粒体自噬机制的研究进展[J]. 微生物与感染, 2018, 13(2): 102-106.
- [33] 李德林, 高建. 自噬对 Nrf2/ARE 通路的调控及在肝脏疾病中的作用[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(10): 1135-1138.
- [34] 刘春晖, 周玲玲, 马可迅, 等. 从自噬角度研究雷公藤甲素引起 HepG2 细胞肝毒性的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(10): 99-103.
- [35] 于洋, 徐治, 刘师兵, 等. 过氧化氢通过内质网应激信号通路对 Hela 细胞自噬和凋亡的诱导作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2015, 41(3): 437-441.
- [36] Rubinsztein, D.C., Cuervo, A.M., Ravikumar, B., *et al.* (2009) In Search of an "Autophagometer". *Autophagy*, **5**, 585-589. <https://doi.org/10.4161/auto.5.5.8823>
- [37] Chen, Z.-H., Lam, H.C., Jin, Y., *et al.* (2010) Autophagy Protein Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain-3B (LC3B) Activates Extrinsic Apoptosis during Cigarette Smoke-Induced Emphysema. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 18880-18885. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005574107>
- [38] Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E.H., *et al.* (2014) Self-Consumption: The Interplay of Autophagy and Apoptosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **15**, 81-94. <https://doi.org/10.1038/nrm3735>

- [39] Yao, J., Jiang, Z., Duan, W., *et al.* (2008) Involvement of Mitochondrial Pathway in Triptolide-Induced Cytotoxicity in Human Normal Liver L-02 Cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **31**, 592-597. <https://doi.org/10.1248/bpb.31.592>
- [40] 刘泽洲, 许可嘉, 张天娇, 等. 雷公藤甲素诱导小鼠急性肝损伤的形态学研究[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(17): 3207-3211.
- [41] Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., *et al.* (2008) Autophagy Fights Disease through Cellular Self-Digestion. *Nature*, **451**, 1069-1075. <https://doi.org/10.1038/nature06639>
- [42] 刘泽洲, 李健. 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]: [硕士学位论文]. 北京: 北京中医药大学, 2015.