

# CP-25 对甲氨蝶呤诱导大鼠肝损伤的保护作用及其分子机制

许正坤, 汪乾镭, 王 春, 魏 伟

**摘要** 目的 明确芍药苷-6-氧-苯磺酸酯 (CP-25) 对甲氨蝶呤 (MTX) 诱导大鼠肝损伤的保护作用。方法 40 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、CP-25 治疗给药组、CP-25 预防给药组和白藜芦醇预防给药组。采用单次腹腔注射 MTX (20 mg/kg) 的方法构建大鼠肝损伤模型; 采用 ELISA 法测定大鼠血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA) 水平。采用蛋白免疫印迹检测大鼠肝组织白细胞介素 (IL)-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)、Bcl-2-associated X (Bax)、细胞色素 C (Cyt-C)、剪切的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (cleaved-cas8)、cleaved-cas9、NADPH 氧化酶 4 (NOX4) 表达水平。结果 MTX 模型诱导的肝损伤大鼠 ALT、AST 水平较正常组升高 ( $F = 70.23, P < 0.01$ ;  $F = 11.09, P < 0.05$ )。肝组织病理学表现出明显的广泛性炎性细胞浸润、肝小叶结构紊乱及肝细胞肿胀。与模型组相比, CP-25 的预防组和治疗组 ALT、AST 水平降低 ( $F = 62.32, 86.86, P < 0.01$ ;  $F = 16.35, 7.14, P < 0.01$ )。肝组织病理评分降低 ( $F = 18.33, P < 0.01$ ;  $F = 15.47, P < 0.05$ )。进一步研究显示, 与模型组相比, CP-25 的预防组和治疗组促凋亡蛋白 Bax ( $F = 21.37, P < 0.01$ ;  $19.35, P < 0.05$ )、Cyt-C ( $F_{CP-25\text{预防给药组}} = 7.21, P < 0.01$ )、cleaved-cas8 ( $F_{CP-25\text{预防给药组}} = 12.32, P < 0.05$ )、cleaved-cas9 ( $F = 8.41, P < 0.01$ ;  $F = 6.91, P < 0.05$ ) 的表达水平下调, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平上调 ( $F = 13.11, P < 0.01$ ;  $F = 9.93, P < 0.05$ )。同时, 与模型组相比, CP-25 的预防组和治疗组 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平降低 ( $F_{CP-25\text{预防给药组}} = 160.7, 46.55, 28.89, P < 0.01$ ;  $F_{CP-25\text{治疗给药组}} = 127.4, 53.70, 26.46, P < 0.01$ )。MDA、NOX4 水平下调 ( $F_{CP-25\text{预防给药组}} = 31.71, 38.45, P < 0.01$ ;  $F_{CP-25\text{治疗给药组}} = 27.89, 31.27, P < 0.01$ )。GSH 水平上调 ( $F = 39.65, 29.04, P < 0.01$ )。结论 CP-25 对 MTX 肝毒性有良好的治疗作用和保护作用, 该作用可能与其抑制肝组织氧化应激反应、炎性反应且减少组织凋亡水平

有关。

**关键词** 芍药总苷; CP-25; 甲氨蝶呤; 肝毒性; 凋亡**中图分类号** R 965.2**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2023)04-0676-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.026

甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 是抗叶酸类抗代谢药, 主要用于治疗急性淋巴性白血病和 Burkitt's 淋巴瘤<sup>[1-2]</sup>。大剂量甲氨蝶呤用于抗肿瘤治疗时, 其潜在的肝肾功能损伤风险是限制其在临床中使用的主要障碍<sup>[3]</sup>。芍药总苷 (total glucosides of paeony, TGP) 是从芍药根部提取的有效成分。TGP 用于治疗自身免疫性疾病的疗效较好, 副作用小, 但起效缓慢<sup>[4]</sup>。课题组前期研究通过对 TGP 主要活性成分芍药苷 (Paeoniflorin, Pae) 结构修饰获得抗炎免疫调节活性更强的衍生物芍药苷-6'-O-苯磺酸酯 (Paeoniflorin-6'-O-benzene sulfonate, CP-25)。研究<sup>[5-6]</sup>表明 CP-25 与 MTX 联合使用不仅产生强大的协同抗炎作用, CP-25 还对 MTX 诱导的大鼠肾脏损伤具有良好的保护作用。CP-25 可抑制肾脏急性炎症反应, 减少肾小管上皮细胞凋亡水平, 调控肾小管的转运体表达, 促进 MTX 在肾脏排泄, 产生解毒作用。该研究主要考察 CP-25 对 MTX 肝损伤大鼠模型是否具有保护作用及其可能的潜在机制, 旨在为揭示 CP-25 和 MTX 之间的“减毒作用”及其机制。

## 1 材料与方法

**1.1 药物及试剂** CP-25 由安徽医科大学临床药理研究所植化室提供 (纯度 > 98%); MTX 来自中国食品药品检定研究院 (纯度 > 98%); 白藜芦醇由阿拉丁试剂公司提供 (纯度 > 99%); 天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 和丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 生化试剂盒检测购自苏州净化设备公司; HE 染液套装购自武汉 Servicebio 公司; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 测定试剂盒、总超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 测定试剂盒、还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 测定试剂盒 (微板法) 购自南京建成生

2023-02-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81973332)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 安徽省抗炎免疫药物协同创新中心, 合肥 230032

作者简介: 许正坤, 男, 硕士研究生;

魏伟, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn;

王春, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wangchun@ahmu.edu.cn

物工程研究所; BCA 蛋白定量试剂盒购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 兔抗 B 淋巴细胞瘤-2 (B-lymphocyte tumor-2, Bcl-2) 抗体、兔抗  $\beta$ -actin 抗体、膜与辣根过氧化物酶偶联的二抗购自美国 Protein-tech 公司; 兔抗 Bcl-2-associated X (Bcl-2-associated X, Bax) 抗体、兔抗细胞色素 C (cytochrome C, Cyt-C) 抗体、兔抗剪切的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase, cleaved-cas) 8 抗体、cleaved-cas9 抗体、兔抗 NADPH 氧化酶 4 (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4, NOX4) 抗体、兔抗白细胞介素 (interleukin, IL)  $\beta$  抗体、兔抗 IL-6 抗体、兔抗肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 抗体购自美国 Abcam 公司。

**1.2 实验仪器** PowerPac Basic 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); ELx808 酶标仪 (美国 BioTek 公司); 3-30K 高速冷冻离心机 (美国 Sigma 公司); BS-830 全自动生化分析仪 (深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司); DMil 倒置显微镜 (德国 Leica 公司); LAS4000Mini 型化学发光成像分析仪 (美国 GE 公司); DW-HL 528 超低温冰箱 (青岛海尔集团)。

**1.3 动物分组与模型制备** SD 大鼠 40 只, 雄性 8~10 周龄, 体质量 (200  $\pm$  20) g, 清洁级, 由安徽医科大学实验动物中心提供 [合格证号: SCXK (安徽) 2017-001]。当前动物实验获得安徽医科大学动物实验伦理委员会批准后 (编号: LLSC20180203)。实验动物随机分为正常组、模型组、CP-25 治疗给药组 [50 mg/(kg  $\cdot$  d)]、CP-25 预防给药组 [50 mg/(kg  $\cdot$  d)] 和白藜芦醇预防给药组 [20 mg/(kg  $\cdot$  d)]。其中治疗给药组药物在 MTX 注射后第 3 天连续给药 5 d, 预防给药组药物在 MTX 注射前 5 天开始连续给药, 正常组和模型组大鼠给予等体积的溶媒。大鼠单次腹腔注射 MTX (20 mg/kg) 诱导肝损伤模型, 48 h 即可造成大鼠肝损伤。实验共持续 12 d。

#### 1.4 检测指标

**1.4.1 肝功能生化指标** 末次给药后, 处死大鼠, 收集外周血, 分离血清。AST 和 ALT 水平采用相关的生化试剂盒检测。

**1.4.2 肝脏组织病理学<sup>[7]</sup>** 末次给药后, 处死大鼠, 取部分肝脏右页组织, 置于 4% 甲醛溶液中固定, 常规行 HE 染色。肝脏组织病理学评分参照以下标准进行: 正常肝组织细胞未见病变 (0 分); 少部分肝细胞坏死, 轻微炎性细胞浸润, 或伴有肝细胞轻

微肿胀 (1 分); 炎性细胞聚集性浸润, 肝小叶少于 30% 斑块或局灶性肝细胞坏死 (2 分); 较多炎性细胞浸润, 肝小叶 (30% ~ 50%) 的肝细胞坏死、肝小叶结构紊乱 (3 分); 广泛性炎性细胞浸润, 肝小叶超过 50% 的肝细胞坏死和、肝小叶结构紊乱 (4 分)。

**1.4.3 肝脏组织氧化应激分子水平** 取部分肝脏右叶组织, 组织样本中加入 10 倍裂解液, 匀浆后, 10 178 ~ 11 149 r/min 离心 10 min 取上清液用于后续测定。具体步骤参见说明书 (BCA 试剂盒) 进行操作。按照 SOD、GSH 和 MDA 试剂盒说明书分别在 550、420 和 532 nm 处对 SOD、GSH 和 MDA 含量进行测试。酶活力/含量计算公式如下: 总 SOD 活力 = [(对照管吸光度值 - 测试管吸光度值) / 对照管吸光度值] / 50%  $\times$  (反应液总体积 / 取样量) / 蛋白含量; GSH 含量 = [(测定管吸光度值 - 空白管吸光度值) / (标准管吸光度值 - 空白管吸光度值)]  $\times$  标准品浓度 (20  $\times 10^{-3}$  mmol/L)  $\times$  GSH 分子量 (307)  $\times$  样本测试前稀释倍数 / 待测匀浆蛋白浓度 (gprot/L); MDA 含量 = [(测定管吸光度值 - 测试管空白吸光度值) / (标准管吸光度值 - 空白吸光度值)]  $\times$  标准品浓度 / 蛋白含量。

**1.4.4 蛋白免疫印迹** 取部分大鼠肝脏组织, 使用 RIPA 裂解缓冲液从大鼠肝组织中提取总蛋白并对蛋白浓度进行定量 (BCA 试剂盒)。将约 20 mg 蛋白样品上样, 采用 10% 十二烷基硫酸钠/聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离, 并将其转移到聚偏二氟乙烯膜上。采用含 5% 脱脂牛奶的封闭液将膜封闭 2 h 后, 与一抗 4  $^{\circ}$ C 条件下孵育过夜: 抗 Bax (1 : 1 000)、抗 Bcl-2 (1 : 1 000)、抗 Cyt-C (1 : 1 000)、抗 cleaved-cas8 (1 : 1 000)、cleaved-cas9 (1 : 1 000)、抗 NOX4 (1 : 1 000)、抗 IL- $\beta$  (1 : 1 000)、抗 IL-6 (1 : 1 000)、抗 TNF- $\alpha$  (1 : 1 000)。将膜与辣根过氧化物酶偶联的二抗 (1 : 2 000) 在室温下孵育 2 h 后, 于增强化学发光试剂显像。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 15.0 软件进行分析, 所有实验数据的测定值皆以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间差异比较采用单因素方差分析和 LSD 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CP-25 对 MTX 诱导的大鼠肝损伤肝功能生化指标影响** ELISA 法检测各组大鼠血清标本 ALT、AST 水平, 结果显示: 与模型组相比, 正常组 ( $F = 11.09$ ,  $P < 0.05$ )、CP-25 治疗给药组 ( $F = 7.14$ ,

$P < 0.01$ )、CP-25 预防给药组 ( $F = 16.35$ ,  $P < 0.01$ )、阳性药物白藜芦醇组 ( $F = 6.95$ ,  $P < 0.01$ ) AST 的水平降低, 差异有统计学意义; 与模型组相比, 正常组、CP-25 治疗给药组、CP-25 预防给药组、阳性药物白藜芦醇组大鼠肝组织 ALT 水平降低 ( $F = 70.23$ 、 $86.86$ 、 $62.32$ 、 $70.23$ ,  $P < 0.01$ ), 差异有统计学意义。见图 1。结果提示 CP-25 无论是预防给药还是治疗给药均能够显著抑制 MTX 诱发的肝毒性。

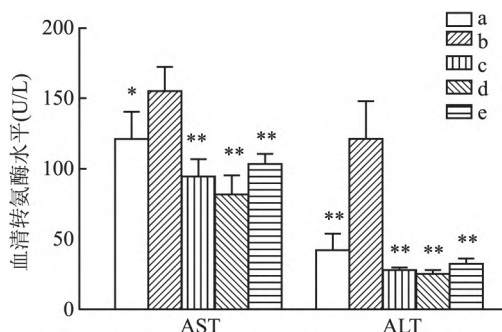


图 1 CP-25 对 MTX 诱导大鼠肝功能损伤的影响 ( $n = 8$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

a: 正常组; b: 模型组; c: CP-25 治疗给药组; d: CP-25 预防给药组; e: 白藜芦醇组; 与模型组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

**2.2 CP-25 对 MTX 诱导的大鼠肝损伤组织病理学的影响** 正常组大鼠肝脏组织细胞呈现出放射状排列, 组织结构正常, 未见细胞变性、坏死。与正常组相比, 模型组大鼠出现肝损伤, 主要特征表现为肝组织广泛性炎性细胞浸润、肝小叶结构紊乱以及肝细胞肿胀。CP-25 治疗给药组 ( $F = 15.47$ ,  $P <$

$0.05$ )、预防给药组 ( $F = 18.33$ ,  $P < 0.01$ ) 以及阳性药物白藜芦醇组 ( $F = 20.87$ ,  $P < 0.01$ ) 大鼠肝组织炎性细胞浸润肝小叶结构异常得到明显改善, 同时组织病理学评分也低于模型组, 差异有统计学意义。见图 2。

**2.3 CP-25 对 MTX 诱导的大鼠肝损伤组织氧化应激的影响** 采用 ELISA 法检测各组大鼠肝组织标本 MDA、SOD、GSH 水平, 结果显示: 与模型组相比, 正常组、CP-25 治疗给药组、CP-25 预防给药组和阳性药物白藜芦醇组大鼠 MDA 含量均降低 ( $F = 31.52$ 、 $27.89$ 、 $31.71$ 、 $34.98$ ,  $P < 0.01$ ), 差异有统计学意义; 模型组大鼠肝组织 SOD 活力低于正常组, 差异有统计学意义 ( $F = 42.63$ ,  $P < 0.01$ ); 但 CP-25 治疗给药组、CP-25 预防给药组、阳性药物白藜芦醇组对 SOD 活力无明显影响; 与模型组相比, 正常组 ( $F = 31.52$ ,  $P < 0.01$ )、CP-25 治疗给药组 ( $F = 29.04$ ,  $P < 0.01$ )、CP-25 预防给药组 ( $F = 39.65$ ,  $P < 0.01$ )、阳性药物白藜芦醇组 ( $F = 10.67$ ,  $P < 0.05$ ) GSH 含量升高, 差异有统计学意义。见图 3A。采用 Western blot 法检测各组大鼠肝组织标本 NOX4 水平, 结果显示: 与模型组相比, 正常组、CP-25 治疗给药组、CP-25 预防给药组大鼠 NOX4 水平均降低, 差异有统计学意义 ( $F = 26.36$ 、 $31.27$ 、 $38.45$ ,  $P < 0.01$ )。见图 3B、C。

**2.4 CP-25 对 MTX 诱导的大鼠肝损伤组织凋亡的影响** 采用 Western blot 法检测各组大鼠肝组织

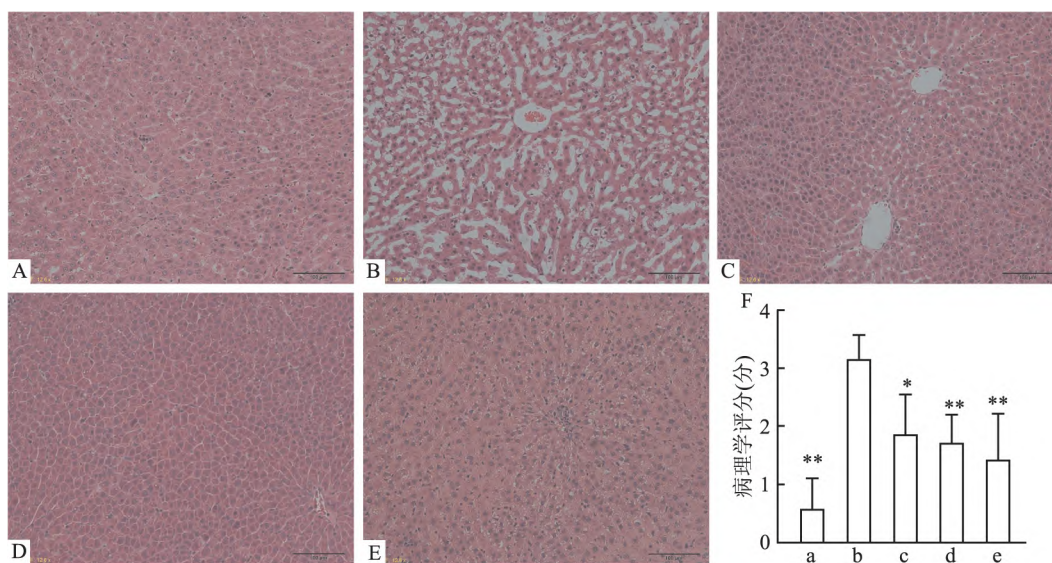


图 2 CP-25 对 MTX 诱导大鼠肝损伤组织病理学的影响 HE  $\times 200$

A: 正常组; B: 模型组; C: CP-25 治疗组; D: CP-25 预防治疗组; E: 白藜芦醇组; F: 病理学评分统计图; a: 正常组; b: 模型组; c: CP-25 治疗给药组; d: CP-25 预防给药组; e: 白藜芦醇组; 与模型组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

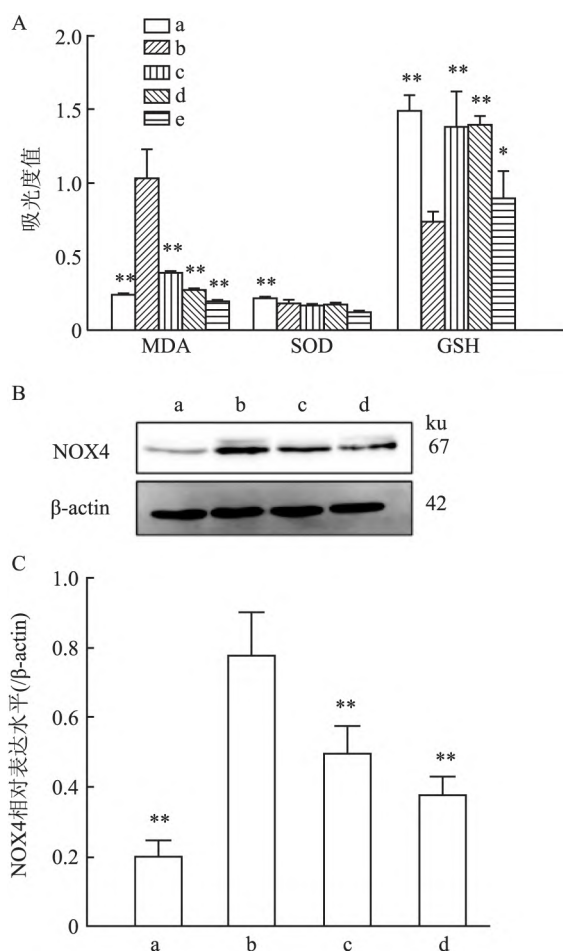


图3 CP-25对MTX诱导的大鼠肝损伤组织氧化应激水平的影响

A: 各组SD大鼠肝组织氧化应激相关指标变化情况; B: Western blot法检测各组肝组织NOX4蛋白相对表达水平; C: 各组SD大鼠肝组织NOX4蛋白相对表达水平统计图; a: 正常组; b: 模型组; c: CP-25治疗给药组; d: CP-25预防给药组; e: 白藜芦醇组; 与模型组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

标本Bax、Bcl-2、Cyt-C、cleaved-cas8、cleaved-cas9蛋白表达水平。结果显示: 与正常组相比, 模型组大鼠肝组织促凋亡蛋白Bax、Cyt-C、cleaved-cas8、cleaved-cas9的表达水平显著上调( $F = 14.13, 7.14, 9.01, 6.91, P < 0.01$ ), 抗凋亡蛋白Bcl-2的表达水平下调( $F = 8.77, P < 0.01$ ), 差异有统计学意义。与模型组相比较: CP-25治疗给药组大鼠促凋亡蛋白Bax、cleaved-cas9的表达水平下调( $F = 19.35, 6.91, P < 0.05$ ), 抗凋亡蛋白Bcl-2的表达水平上调( $F = 9.93, P < 0.05$ ), 差异有统计学意义; CP-25预防给药组Bcl-2的表达水平上调( $F = 13.11, P < 0.01$ ), 促凋亡蛋白Bax( $F = 21.37, P < 0.01$ )、Cyt-C( $F = 7.21, P < 0.01$ )、cleaved-cas9( $F = 8.41, P < 0.01$ )、cleaved-cas8( $F = 12.32, P < 0.05$ )的表达水平下调, 差异有统计学意义。见图4。

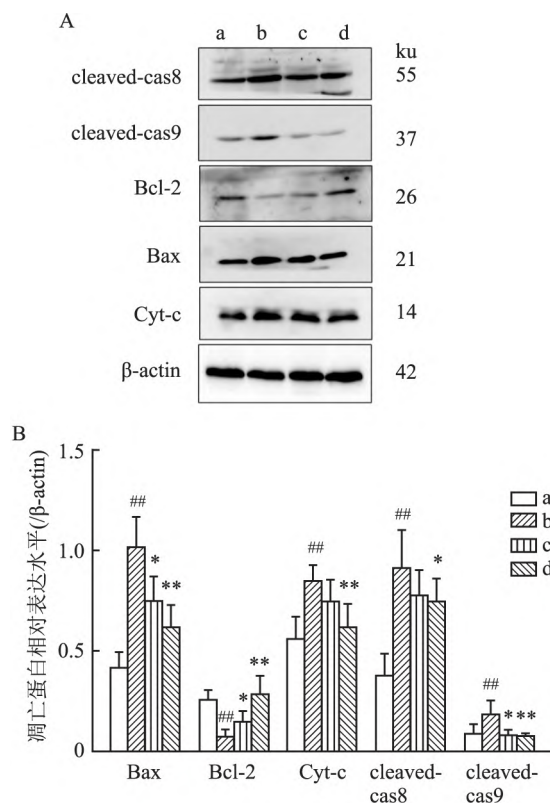


图4 CP-25对MTX诱导的大鼠肝损伤组织凋亡蛋白水平的影响

A: Western blot法检测各组肝组织Bax、Bcl-2、Cyt-C、cleaved-cas8、cleaved-cas9蛋白表达水平; B: 各组SD大鼠肝组织凋亡相关蛋白相对表达统计图; a: 正常组; b: 模型组; c: CP-25治疗给药组; d: CP-25预防给药组; 与正常组比较: ##  $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

**2.5 CP-25对MTX诱导的大鼠肝损伤组织炎症细胞因子的影响** 采用Western blot法检测各组大鼠肝组织标本IL-1β、IL-6和TNF-α蛋白表达水平, 结果显示: 与模型组大鼠相比较, 正常组、CP-25治疗给药组和预防给药组炎症因子IL-1β、IL-6和TNF-α的表达水平均下调, 差异有统计学意义( $F_{\text{正常组}} = 101.50, 44.07, 19.89, P < 0.01$ ;  $F_{\text{治疗给药组}} = 127.40, 53.70, 26.46, P < 0.01$ ;  $F_{\text{预防给药组}} = 160.70, 46.55, 28.89, P < 0.01$ )。见图5。

### 3 讨论

MTX是一种免疫抑制剂和化疗药物, 在临床上主要用于治疗肿瘤、类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)等疾病。大剂量MTX主要用于治疗血液系统肿瘤和一些实体恶性肿瘤<sup>[8-9]</sup>。MTX在使用过程中常会出现多种较为严重的不良反应, 如肝肾损伤。大剂量MTX在治疗肿瘤患者时引起的肝毒性发生率较高。研究<sup>[10]</sup>表明骨肉瘤患者使用抗

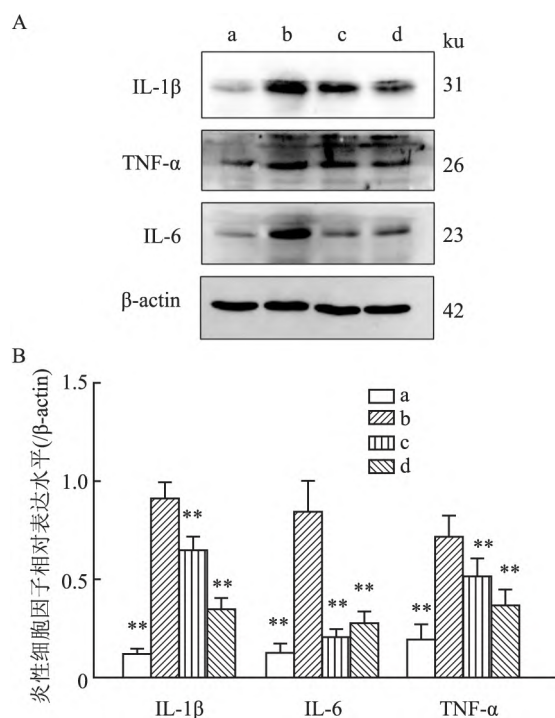


图5 CP-25 给药对 MTX 诱导大鼠肝损伤组织炎症细胞因子水平的影响

A: Western blot 法检测各组肝组织 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  蛋白表达水平; B: 各组 SD 大鼠肝组织炎症细胞因子相对表达水平统计图; a: 正常组; b: 模型组; c: CP-25 治疗给药组; d: CP-25 预防给药组; 与模型组比较: \*\*  $P < 0.01$

肿瘤剂量 MTX 的肝毒性发生率高达 58.0%。但是 MTX 在小剂量 MTX 治疗 RA 也会出现肝损伤不良反应,有研究报道小剂量 MTX 在长期使用过程中,可以导致近 13% 的患者转氨酶显著增强,约有 3.7% 的患者因肝毒性不得不终止用药<sup>[11-12]</sup>。在预防 MTX 可能导致的肝脏损伤尚没有有效的治疗手段。目前普遍认为,MTX 肝毒性与其主要代谢物多聚谷氨酸 MTX 长时间停留在肝脏组织和细胞,且在高浓度情况下诱发的氧化应激水平失衡、炎症反应以及组织坏死和凋亡有关<sup>[13]</sup>。

TGP 是来源于白芍提取的有效部位,具有抑制自身免疫反应、抗炎、止痛、保肝等多种药理作用。临床上 TGP 主要和慢作用抗风湿药(disease-modifying anti-rheumatic drugs, DMARDs)联合应用治疗 RA,起到增效减毒作用。现代研究<sup>[14-16]</sup>证明 TGP 具有一定的保肝作用,无论是对化学性肝损伤还是免疫性肝损伤都有明显的保护作用。课题组前期对 TGP 主要活性成分 Pae 进行结构改造获得了抗炎免疫调节活性更强的新型活性单体 CP-25。课题组已有研究<sup>[6]</sup>表明 CP-25 与 MTX/来氟米特联合给药也具有

增效减毒作用,可协同抑制大鼠关节炎模型的炎症反应,改善全身免疫反应至生理水平。CP-25 还对 MTX 诱导的肾毒性具有显著的抑制作用,可抑制 MTX 肾脏急性炎症反应,减少肾小管上皮细胞凋亡水平,调控肾小管的有机阴离子转运体表达和功能恢复,促进有机阴离子转运体作用底物 MTX 在肾脏排泄,产生解毒作用。上述结果提示 CP-25 对 MTX 的肝毒性可能具有一定的保护作用。

本研究表明 CP-25 无论是预防给药还是治疗给药均能够显著抑制 MTX 诱发的肝毒性,降低 ALT 和 AST 水平,减少肝组织广泛性炎症细胞浸润、肝小叶结构紊乱及肝细胞肿胀等组织形态学特征,表明 CP-25 联合 MTX 给药可以减少 MTX 的肝毒性。MTX 肝毒性主要与组织氧化应激水平失衡、组织坏死性凋亡等因素有关<sup>[12]</sup>。MDA、GSH 和 NOX4 的产生源于自由基作用于脂质的过程,并能损伤细胞,因此他们的含量是氧化应激机制中抗氧化系统的重要检测指标,能够反映出机体抗氧化作用的潜在能力、脂质过氧化速率及损伤程度。本研究表明 CP-25 联合 MTX 给药能够明显抑制 MTX 诱导的氧化应激失衡,降低 MDA 和氧化酶 NOX4 水平、恢复 GSH 水平近生理水平,由此提示,CP-25 联合用药后,MTX 所致大鼠的氧化应激反应得到不同程度的恢复。炎症反应在肝损伤发生发展过程中扮演重要角色。适量 TNF- $\alpha$  可以在肝脏受损后刺激正常肝细胞的增殖,促进肝细胞的再生,过量则可诱导肝细胞损伤和凋亡;与其相似的是,适量的 IL-1 $\beta$  和 IL-6 能促进肝细胞再生,减轻炎症反应,而在 MTX 的刺激下,过量的 IL-1 会刺激成纤维细胞上的 IL-1 受体(IL-1r),致使成纤维细胞发生变性、沉积形成肝纤维化;IL-6 则直接刺激肝脏中的成纤维细胞、脂肪细胞、Kupffer 细胞等分泌细胞因子,导致肝脏组织发生炎症反应、脂肪堆积和纤维化,CP-25 联合用药后可以降低模型大鼠肝组织炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平,由此提示,CP-25 联合用药后,MTX 所致大鼠的肝脏炎症反应得到一定程度的恢复。同时经 CP-25 联合用药后,细胞凋亡相关蛋白 Bax、Cyt-C、cleaved-cas8、cleaved-cas9 的异常表达均有所改善,基本恢复到正常水平,表明 CP-25 能够通过调控凋亡相关蛋白之间的平衡发挥肝保护作用。课题组前期研究<sup>[5]</sup>表明 CP-25 在体外对 MTX 诱导的细胞凋亡具有直接抑制作用,提示 CP-25 对 MTX 的细胞毒作用具有直接的对抗作用。

综上所述,CP-25 对 MTX 诱导的肝毒性具有保

护作用,其机制可能与抑制肝组织氧化应激反应、炎症反应和降低凋亡水平有关。但其具体分子保护机制还有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] Carbone P P. Progress in the systemic treatment of cancer. Concepts, trials, drugs, and biologics[J]. *Cancer*, 1990, 65(3 Suppl): 625–33.
- [2] Bowman W P, Shuster J J, Cook B, et al. Improved survival for children with B-cell acute lymphoblastic leukemia and stage IV small noncleaved-cell lymphoma: a pediatric oncology group study [J]. *J Clin Oncol*, 1996, 14(4): 1252–61.
- [3] Howard S C, McCormick J, Pui C H, et al. Preventing and managing toxicities of high-dose methotrexate[J]. *Oncologist* 2016, 21(12): 1471–82.
- [4] Yang X Z, Wei W. CP-25, a compound derived from paeoniflorin: research advance on its pharmacological actions and mechanisms in the treatment of inflammation and immune diseases [J]. *Acta Pharmacol Sin* 2020, 41(11): 1387–94.
- [5] Wei X, Wu Y, Tang H, et al. CP-25 ameliorates methotrexate induced nephrotoxicity via improving renal apoptosis and methotrexate excretion [J]. *J Pharmacol Sci* 2021, 146(1): 21–8.
- [6] Yang X, Zhao Y, Jia X, et al. CP-25 combined with MTX/LEF ameliorates the progression of adjuvant-induced arthritis by the inhibition on GRK2 translocation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 834–43.
- [7] 黄伟,王丛笑,吕莉莉等. 酒肝平胶囊对动物酒精性及药物性肝损伤病理组织学的影响[J]. *中草药* 2009, 40(S1): 182–7.
- [8] Salliot C, van der Heijde D. Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research [J]. *Ann Rheum Dis* 2009, 68(7): 1100–4.
- [9] Larsen E C, Devidas M, Chen S, et al. Dexamethasone and high-dose methotrexate improve outcome for children and young adults with high-risk B-acute lymphoblastic leukemia: a report from children's oncology group study AALL0232 [J]. *J Clin Oncol* 2016, 34(20): 2380–8.
- [10] Abe K, Maeda-Minami A, Ishizu T, et al. Risk factors for hepatic toxicity of high-dose methotrexate in patients with osteosarcoma [J]. *Anticancer Res* 2022, 42(2): 1043–50.
- [11] Salliot C, van der Heijde D. Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research [J]. *Ann Rheum Dis* 2009, 68(7): 1100–4.
- [12] Verstappen S M, Bakker M F, Heurkens A H, et al. Utrecht rheumatoid arthritis cohort study group. Adverse events and factors associated with toxicity in patients with early rheumatoid arthritis treated with methotrexate tight control therapy: the CAMERA study [J]. *Ann Rheum Dis* 2010, 69(6): 1044–8.
- [13] Ezhilarasan D. Hepatotoxic potentials of methotrexate: understanding the possible toxicological molecular mechanisms [J]. *Toxicology*, 2021, 458: 152840.
- [14] 詹可顺,王华,魏伟. 白芍总苷对小鼠化学性肝损伤的保护作用及机制[J]. *安徽医科大学学报* 2006, 41(6): 664–6.
- [15] 王华,魏伟,岳莉等. 白芍总苷对卡介苗加脂多糖引起的小鼠免疫性肝损伤的保护作用 [J]. *中国药理学通报*, 2004, 20(8): 875–8.
- [16] 李瑞麟,马勇,魏伟等. 白芍总苷治疗四氯化碳致大鼠肝纤维化的作用与其影响肝星状细胞功能的关系 [J]. *中国新药杂志* 2007, 16(9): 685–9.

## Protective effect of CP-25 on methotrexate-induced liver injury in rats and its molecular mechanism

Xu Zhengkun, Wang Qianlei, Wang Chun, Wei Wei

(Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Drugs, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the protective effect of Paeoniflorin-6'-O-benzene sulfonate (CP-25) on methotrexate (MTX)-induced liver injury in rats. **Methods** 40 SD rats were randomly divided into normal group, model group, CP-25 treatment group, CP-25 prevention group and resveratrol prevention group. A rat model of liver injury was established by single intraperitoneal injection of MTX (20 mg/kg), the levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) were determined by ELISA, the levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), B-lymphocyte tumor-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X (Bax), cytochrome C (Cyt-C), cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 8 (cleaved-cas8), cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 9 (cleaved-cas9) and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4 (NOX4) containing

网络出版时间: 2023-03-28 13:46:05 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20230328.1034.027.html>

## SDC2 和 TFPI2 基因甲基化联合检测在结直肠癌 早期筛查中的应用价值

储梦真, 唐宜桂, 张敏, 胡媛媛, 徐家丹, 张洋, 杨玉萍, 汪安勇, 王中新

**摘要** 目的 探讨粪便样本中硫酸类肝素蛋白多糖基因 (SDC2) 甲基化和组织因子途径抑制物 2 基因 (TFPI2) 甲基化联合检测在结直肠癌早期筛查中的应用价值。方法 选取 106 例结直肠癌患者 (结直肠癌组)、75 例进展期腺瘤患者 (进展期腺瘤组)、35 例非进展期腺瘤患者 (非进展期腺瘤组) 为研究对象, 并以同期 153 例其他消化系统干扰性疾病患者、182 例结肠镜检查结果为阴性者作为对照组, 采用甲基化荧光定量 PCR (qMSP) 法对所有受试者的粪便标本进行 SDC2 和 TFPI2 基因甲基化检测。以结肠镜检查及病理检查结果为金标准, 评估 SDC2 和 TFPI2 基因甲基化联合检测对结直肠癌和腺瘤检测的灵敏度和特异度。结果 106 例结直肠癌患者中, 甲基化联合检测灵敏度为 93.4%; 75 例进展期腺瘤患者中, 甲基化联合检测灵敏度为 62.7%; 35 例非进

展期腺瘤患者中, 甲基化联合检测灵敏度为 34.3%; SDC2 和 TFPI2 基因甲基化联合检测对结直肠癌和腺瘤筛查的特异性为 94.6%。结论 SDC2 和 TFPI2 基因甲基化联合检测对结直肠癌及其早期病变具有较高的灵敏度, 同时保持较高的特异性。

**关键词** 结直肠癌; 甲基化; SDC2 基因; TFPI2 基因

中图分类号 R 446.13

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)04-0682-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.027

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是常见的消化系统恶性肿瘤之一。结直肠癌起病隐匿, 患者出现明显症状至确诊往往已发展为中晚期, 患者预后差。结直肠癌的早期诊断对患者的治疗及预后具有重要的临床意义。目前, 结直肠癌诊断金标准为结肠镜, 但结肠镜检查的侵入性和复杂的肠道准备使得肠镜不易被患者接受。粪便隐血试验 (fecal occult blood test, FOBT) 是目前临床上应用最为广泛的肠道病变筛查方法, 受其他消化系统疾病的干扰,

2023-02-27 接收

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目 (编号: KJ2017A208)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院检验科, 合肥 230022

作者简介: 储梦真, 女, 检验技师;

王中新, 男, 主任技师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: ay-

wzhx87@163.com

cysteine were assessed by Western blot. **Results** Compared with the normal group, the levels of ALT and AST in MTX-induced liver injury model rats increased ( $F = 70.23$ ,  $P < 0.01$ ;  $F = 11.09$ ,  $P < 0.05$ ), and the liver histopathology showed extensive inflammatory cell infiltration, hepatic lobular structure disorder and hepatocyte swelling. Compared with MTX model group, the levels of ALT and AST in CP-25 prevention group and treatment group were lower ( $F = 62.32$ ,  $86.86$ ,  $P < 0.01$ ;  $F = 16.35$ ,  $7.14$ ,  $P < 0.01$ ), and the pathological score of liver tissue was lower ( $F = 18.33$ ,  $P < 0.01$ ;  $F = 15.47$ ,  $P < 0.05$ ). Further studies showed that compared with MTX model group, both CP-25 prevention group and treatment group could significantly down-regulate the expression of pro-apoptotic proteins Bax ( $F = 21.37$ ,  $P < 0.01$ ;  $F = 19.35$ ,  $P < 0.05$ ), Cyt-C ( $F_{\text{CP-25 prevention group}} = 7.21$ ,  $P < 0.01$ ), cleaved-cas8 ( $F_{\text{CP-25 prevention group}} = 12.32$ ,  $P < 0.05$ ) and cleaved-cas9 ( $F = 8.41$ ,  $P < 0.01$ ;  $F = 6.91$ ,  $P < 0.05$ ), and up-regulate the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 ( $F = 13.11$ ,  $P < 0.01$ ;  $F = 9.93$ ,  $P < 0.05$ ). At the same time, compared with MTX model group, CP-25 prevention group and treatment group decreased the levels of IL- $1\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  ( $F_{\text{CP-25 prevention group}} = 160.7$ ,  $46.55$ ,  $28.89$ ,  $P < 0.01$ ;  $F_{\text{CP-25 treatment group}} = 127.4$ ,  $53.70$ ,  $26.46$ ,  $P < 0.01$ ), down-regulated the levels of MDA and NOX4 ( $F_{\text{CP-25 prevention group}} = 31.71$ ,  $38.45$ ,  $P < 0.01$ ;  $F_{\text{CP-25 treatment group}} = 27.89$ ,  $31.27$ ,  $P < 0.01$ ), and up-regulated the level of GSH ( $F = 39.65$ ,  $29.04$ ,  $P < 0.01$ ).

**Conclusion** CP-25 has a good therapeutic and protective effect on hepatotoxicity induced by MTX, and this effect may be related to its inhibition of oxidative stress, inflammatory response, and reduction of apoptosis in liver tissue.

**Key words** total glucosides of paeony; CP-25; methotrexate; hepatotoxicity; apoptosis