

治疗牦牛腹泻的藏药组方安全性评价及肝毒性机制研究

次仁旺堆¹, 贾乐娟², 黄雨榕², 洛桑次仁¹,
罗布次仁¹, 张辉^{2,3}, 李英², 常振宇³

(1. 林芝市农牧技术推广中心, 西藏 林芝 860000; 2. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642; 3. 西藏农牧大学动物科学学院, 西藏 林芝 860000)

摘要: 牦牛是青藏高原特有的家畜, 也是世界上生活在海拔最高处的哺乳动物。因特殊的饲养方式及生活的高原环境恶劣, 再加上饲养管理不到位, 在牦牛养殖过程中常发生腹泻。牦牛发生腹泻后会导致脱水 and 消瘦, 急性腹泻还会带来发热、排便便等并发症, 而慢性腹泻会使牦牛的食欲不振、精神萎靡、营养不良甚至最终导致死亡, 给牦牛养殖场带来较为严重的经济损失。研制了一种治疗牦牛腹泻的藏药组方, 将不同剂量的药物灌胃小鼠, 观察小鼠的临床指标变化和肝脏的病理变化。选择病理变化最明显的剂量, 用实时荧光定量 PCR 及 Western blot 实验检测该剂量是否通过调节小鼠肝脏组织凋亡、自噬通路导致肝脏的病理变化。结果表明: 该藏药组方在低至中剂量范围内未引起明显的毒性反应, 而高剂量组则导致小鼠出现摄食减少、体质量增长抑制、精神萎靡及肝损伤等症状。肝脏病理显示, 高剂量组出现肝细胞排列紊乱、血窦扩张及局灶性坏死。分子机制研究发现: 高剂量可显著上调自噬相关基因 (*Atg5*、*LC3b*) 的表达, 并激活线粒体凋亡途径, 表现为细胞色素 c (*CytC*) 释放及 *caspase-9* 显著升高。

关键词: 藏药组方; 牦牛; 腹泻; 安全性评价; 肝毒性机制

中图分类号: S823.85

文献标识码: A

Safety Evaluation and Hepatotoxicity Mechanism of a Xizang Medicine Formula for Treating Yak Diarrhea

Cirenwangdui¹, JIA Lejuan², HUANG Yurong², Luosangciren¹, Luobuciren¹, ZHANG Hui^{2,3}, LI Ying², CHANG Zhenyu³

(1. Nyingchi Agriculture and Animal Husbandry Technology Extension Center, Nyingchi Xizang 860000, China; 2. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou Guangdong 510642, China; 3. College of Animal Science, Xizang Agricultural and Animal Husbandry University, Nyingchi Xizang 860000, China)

Abstract: The yak (*Bos mutus*) is a livestock species endemic to the Qinghai-Xizang Plateau and the highest-altitude mammal in the world. Due to the unique feeding mode, harsh plateau environment and inadequate management, diarrhea frequently occurs in yak breeding. Diarrhea causes dehydration and emaciation in yaks; acute diarrhea is accompanied by complications such as fever and bloody feces, while chronic diarrhea leads to anorexia, lethargy, malnutrition and even death, causing serious economic losses to yak farms. A Xizang medicine formula for treating yak diarrhea was developed, and different doses of the formula were intragastrically administered to mice to observe clinical indicators and liver pathological changes. The dose with the most obvious pathological changes was selected to detect whether it caused liver pathological damage by regulating apoptosis and autophagy pathways in mouse liver tissue using qRT-PCR and Western blot. The results showed that the Xizang medicine formula caused no obvious toxic reactions at low to medium doses, while high dose led to reduced food intake, inhibited body weight gain, lethargy and liver injury in mice. Liver pathology showed disordered hepatocyte arrangement, sinusoidal dilation and focal necrosis in the high-dose group. Molecular mechanism studies revealed that high dose significantly up-regulated the expression of autophagy-related genes (*Atg5*, *LC3b*) and activated the mitochondrial apoptosis pathway, characterized by cytochrome c (*CytC*) release and significantly increased *caspase-9*.

Key words: Xizang medicine formula; yak; diarrhea; safety evaluation; hepatotoxicity mechanism

收稿日期: 2025-12-28

基金项目: 西藏自治区科技计划项目 (XZ202401 YD0005); 西藏林芝市科技计划项目 (XDHZ-2025-02)。

作者简介: 次仁旺堆 (1984—), 男, 高级兽医师, 主要从事藏兽药及家畜繁育与推广, E-mail: ciwang888456@163.com。

牦牛(*Bos mutus*)是青藏高原特有的家畜,被誉为“高原之舟”“高原之宝”。牦牛肉质鲜美,脂肪含量低,蛋白质含量高,毛皮还可用于制作衣物和帐篷,具有较高的经济价值。

牦牛主要生活在青藏高原海拔3 000 m以上的高寒地区。在中国,牦牛主要分布在青海、西藏、四川、甘肃等省份^[1-2]。饲养牦牛的方式多为散养,因其特殊的饲养方式及其生活的高原环境恶劣,再加上饲养管理不到位,在养殖过程中常发生牦牛腹泻^[3]。牦牛发生腹泻后会导致脱水和消瘦,急性腹泻还会带来发热、排便便等并发症,而慢性腹泻会使牦牛的食欲不振、精神萎靡、营养不良甚至死亡^[4],给牦牛养殖场带来较为严重的经济损失。

牦牛腹泻的治疗手段多样,包括化学药物治疗、中藏药制剂、益生菌应用等。药物治疗方面,常用的抗生素包括庆大霉素、诺氟沙星、土霉素等^[5]。然而,由于抗生素的耐药性和畜产品药残问题,越来越多的研究开始关注中药和藏药的应用。西宁动物园的杨文斌等^[6]对园内1只雌性成年胃肠炎牦牛采用了中西医结合疗法,效果明显。也有学者研究表明乳酸杆菌对牦牛大肠黏膜屏障具有保护作用^[7]。

藏药医学是中医体系中的民族特色医学,长期以来在治疗藏族地区人民和畜禽常见病方面功不可没。次仁旺堆等^[8]的研究证明藏医理论以“隆”(风/气)、“赤巴”(火/能量)、“培根”(水/土)3要素的平衡为核心,认为犏牛腹泻源于三者功能失调,或过盛或不足,导致消化吸收紊乱。治疗则强调辨证施治,针对3要素的盛衰与脾胃肠道等具体病位,采用相应藏药以恢复平衡。李登宇等^[9]曾将小鼠以牦牛源沙门氏菌H42造模,并以藏药仁青芒觉、坐珠达西、地榆、黄连、诃子等灌胃小鼠,结果发现以上藏药对牦牛源沙门氏菌H42有较好的抑菌效果。藏药九味防瘟散不仅在盲肠结扎所致脓毒症模型中对小鼠具有保护作用,还能减轻脂多糖(LPS)诱导的脓毒症小鼠的急性肺损伤^[10]。有调查研究表明,藏药因其成分丰富、药理活性多样,在高原低氧脑损伤的预防和治疗中呈现出多靶点、多层面、多途径协同作用的显著优势^[11],且临床疗效显著^[12]。由此可见,藏药的功效明显,亟待更广泛的研究以挖掘其作用。

根据藏药“隆”、“赤巴”、“培根”3要素失衡而引起腹泻的理论,笔者研制出了本藏药组方。本组方主要由黄连、诃子、藏红花、麝香等藏药组成,主要通过抗炎、抗氧化及修复肠道屏障等功能,对消化道疾病发挥治疗作用。黄连主要活性成分小檗碱^[13],具有显著的抗炎、抗氧化特性,不仅能有效治疗细菌性胃肠炎与腹泻,还能改善肠道绒毛形态与调节代谢^[14]。诃子作为传统的涩肠止泻药,其提取物被证实能够增强肠道屏障功能,修复黏膜损伤,促进肠上皮恢复^[15-16]。藏红花的核心成分藏红花素,有抗炎与抗氧化应激的能力,可减轻结肠炎症^[17-18],有助于调节肠道菌群平衡。此外,传统名贵药材麝香,在藏医与现代应用中均显示出良好的消肿镇痛功效^[19-20],能有效促进肛肠部位创面的愈合与恢复。综上,这些药物可通过多重途径,协同治疗腹泻及相关消化道疾病。

由于中草药的天然来源和悠久的使用历史,通常被认为是安全的。但许多中草药会产生次级代谢物质,这些物质往往与药理活性化合物难以区分^[21],容易造成不良反应,甚至肝毒性。当停止用药后,这些副作用和毒性通常也可以逆转。肝脏是一个关键的前线免疫组织,由于其特殊的结构,在产生蛋白质、代谢营养物质和清除毒素等方面至关重要,是机体与外界之间的重要屏障^[22]。临床上,除少数已证实无肝损伤的中药外,中草药或中草药产品都可能与中毒性肝病风险有关^[23]。有研究回顾了38例因服用何首乌及其制剂而导致肝损害的病例^[24],提示药物毒性评价的重要性。肝脏由于功能特殊,往往在药物中毒时受到首要伤害。2009年1月至2014年1月在对解放军第302医院595例因中药导致肝损伤的住院患者进行因果关系评价中,发现中药可导致肝损伤甚至死亡^[25]。因而在实践中应重视中药的肝毒性,在本藏药组方研制成功后及时进行了毒性实验,选择肝脏为主要的评价对象,通过病理切片、实时荧光定量PCR、Western blot实验等探究本组方的毒性作用以及是否对小鼠肝脏组织造成了影响。

1 材料与方法

1.1 动物

50只6~7周龄的SPF级ICR小鼠,体质量

20~22 g,雌雄各半,购于广州锐格生物科技有限公司。小鼠到达后安置于环境温度 23~25 ℃、湿度 40%~60%、12 h 明暗交替循环的室内空间,经过 7 d 的适应期,随机分为 5 组($n=10$,雌雄各半)。

1.2 主要试剂

多聚甲醛粉末、75%酒精、二甲苯、甲醇,广州化学试剂厂;96孔荧光定量 PCR 板,乐泰生物科技有限公司;Trizol 裂解液,大连宝生物工程有限公司;SDS-PAGE 凝胶试剂盒,雅酶生物科技有限公司;PMSF、Ripa 裂解液,反转录试剂盒、荧光定量试剂盒、BCA 蛋白浓度试剂盒、通用型抗体稀释液,上海碧云天生物技术有限公司;PVDF 膜, Sigma 公司;ECL 超敏化学发光试剂盒,南京诺唯赞生物科技有限公司。

1.3 主要仪器

分析天平(ME204 型),梅特勒托利多;实时荧光定量 PCR 仪(LightCycler 480 型)美国 Roche 公司;电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9123A 型),上海一恒科技有限公司;核酸浓度测定仪(Nanodrop2000 型),美国 Thermo Fisher 科技公司;低温离心机(Centrifuge 5804R),德国 Eppendorf 公司;电泳仪(EP600 型),上海天能科技有限公司;光学显微镜(DM1000 型),德国徕卡;涡旋混合器(XW-80C 型),上海医科大学仪器厂;基本型加热磁力搅拌器(RH Basic 2 型),德国 IKA 公司;pH 计(PB-10 型),德国赛多利斯公司;全自动化学发光成像系统(GelView 6000 Pro),广州博鹭腾仪器仪表有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 药物水煎剂的制备

1)将配制而成的药物打磨成粉末,过筛 80 目,粗粒可再次打磨、过筛;2)在电子天平上准确称取 100 g 藏药组方粉末,放入锥形瓶中,加入 2 L 双蒸水浸泡 12h;3)超声破碎 30 min;滤出药液,再加入 1 L 双蒸水与药渣混合,超声破碎 30 min,滤出药液。4)将两次所得药液与药渣混合,用砂锅煮沸 1 h,8 层纱布过滤药渣;再用超速离心机离心药液,取上清液,弃药渣;5)使用旋转蒸发器调整药液浓度至 1 g/mL。6)自然冷却所得药液,于超净台内分装后盖上瓶盖,封口,置于冰箱 4 ℃ 保存,使用时用双蒸水稀释成所需浓度。

1.4.2 动物分组与处理

6~7 周龄的 SPF 级 ICR 小鼠 50 只,雌雄各半。经过 7 d 的适应期,随机分为 5 组($n=10$,雌雄各半):对照组(每 10 g 体质量),低剂量组(20 mg, L),中剂量组(100 mg, M),中高剂量组(200 mg, MH),高剂量组(400 mg, H)。按照每 10 g 体质量 0.2 mL 给小鼠灌胃对应剂量的药物,每日灌胃 1 次(高剂量所需药量较多则分两次灌胃),灌胃前需给小鼠禁食 4 h,饮水不限。毒性实验根据 7 日疗程计算,第 7 日灌胃小鼠的 12 h 后处死小鼠采样。在实验中,小鼠均自由饮水与采食;每日称小鼠体质量、查看小鼠体况;每 2 d 更换新鲜垫料。本研究中动物实验严格遵守动物福利,操作步骤严格按照广东省《实验动物福利与伦理审查指南》进行,并得到华南农业大学动物保护与使用委员会批准。

1.4.3 动物肝脏组织采样

断颈处死小鼠后立即采集小鼠的肝脏样本,将肝脏浸入 1× PBS 中,并轻轻划动以去除组织上的血液。将肝脏切成 3×3 cm 的小块,放入装有甲醛的 EP 管中固定,用于后续 HE 染色等组织实验;其余肝脏样本则装入管中于液氮中快速冷冻,然后在 -80 ℃ 下保存,用于分子生物学实验。

1.4.4 HE 染色

55 ℃ 烤片 1 h,自然冷却至室温,用二甲苯、高浓度至低浓度的梯度乙醇中溶蜡复水,用苏木精核染 6 min,双蒸水轻轻冲去玻片上残留的苏木精,用 1% 的盐酸酒精分化 10 s 后,立刻放入水中,再用龙头水返蓝 15 min。低浓度至高浓度梯度乙醇中脱水,伊红染液 2 min,再放入无水乙醇、二甲苯,中性树脂封片。

1.4.5 实时荧光定量 PCR

从 -80 ℃ 冰箱保存的小鼠肝脏组织中提取总 RNA,使用 TRIZOL 法提取,并严格按照说明书进行处理。用 DEPC 水溶解肝脏组织的 RNA 后,使用 NANOdrop™ OneC 来测定总 RNA 的质量和浓度。使用 ABScript Neo RT Master Mix for qPCR with gDNA Remover (RK20433, abclonal, China) 在 PCR 机上将 mRNA 逆转录为 cDNA,逆转录程序设置为 37 ℃ 2 min,55 ℃ 15 min,85 ℃ 5 min。cDNA 采用 Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (No ROX)

(RK21205, abclonal, China), 程序为 95 °C 3 min, 后设置 40 个循环, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 然后根据试剂盒的规格进行熔融曲线分析。qRT-PCR 所用的引物采用美国国家生物技术信息中心 (NCBI)

引物设计工具进行设计, 引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成 (表 1)。选择管家基因 GAPDH 对数据进行归一化处理, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析目的基因的表达情况, 检测转录水平。

表 1 本研究所使用的引物序列

基因	正向引物序列(5'-3')	反向引物序列(3'-5')
GAPDH	GTCGGTGTGAACGGATTTG	CAATCTCCACTTTGCCACTG
mTOR	TCCTGACCCTGATATCCGCT	GTTTCATGCTGCTTAGTCGGC
p62	GGACCCATCTACAGAGGCTG	ATCACAATGGTGGAGGGTGC
Atg5	GCAGAATGACCACGACGGAG	GGTAGCTCAGATGCTCGCTC
LC3b	AGCAGCACCCACCAAGAT	CACCATGCTGTGCCCATTC
Beclin1	GCTGTAGCCAGCCTCTGAAA	TGAGGAATAGTAAGCACCTGGC
Bax	CTGGATCCAAGACCAGGGTG	CCTTCCCCCTTCCCCCATTC
Bcl2	ATTCCTCTGTGCGCTTCTGAG	AGGAGAGAAAGTCGACCACCA
CytC	TCCACGGTCAGGCTATAAACG	CTGGATCACCCGCAGGAATA
APAF1	TGGCTGTCAAGCTCAAGGAG	GCTTCAAGCTGATTCCCCCT
Caspase-9	GTGACTCTGAGCCAGATGCT	AGAATGCCATCCAAGGTCTCG

1.4.6 Western blot 实验

将肝脏组织从 -80 °C 冰箱中取出, 切取 25~50 mg 肝脏组织放入研磨管中, 加入 250 μ L Ripa + Pmsf (50 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、1% Triton X-100、1% 脱氧胆酸钠、0.1% SDS 和正钒酸钠)。充分研磨组织, 确保磨碎后使用离心机 4 °C、12 000 xg 离心 10 min。将研磨管从离心机中取出, 吸取上清液即为蛋白原液, 并使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 严格按照 BCA 试剂盒的说明书步骤操作。用 Ripa + Pmsf 将蛋白原液定量到 1.25 μ g/ μ L, 再以 4 : 1 的比例加入适量 Loading buffer 后将蛋白放于沸水中煮 10 min, 自然晾凉后分装、上样, 暂时不用的保存于 -80 °C 冰箱。将提取的蛋白等量电泳, 然后在转印膜上进行电印, 采用湿式电泳法。转膜完成后用 1 \times TBST 清洗条带 3 次、每次 5 min, 再用脱脂奶粉封闭条带 1 h, 完成后清洗 3 次, 每次 5 min。稀释对应抗体, 将条带浸入其中, 在 4 °C 孵育 14~16 h。完成后回收抗体, 清洗条带 3 次后将条带浸入对应二抗, 室温孵育 1 h, 清洗 3 次后即可显影照胶。

1.4.7 统计分析

用 GraphPad Prism 9.0 将数据进行分析并作图。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 *t* 检验分析各组之间的差异, *p* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 动物的临床表现

小鼠适应性饲养 7 d 后分为 5 组, 于每日固定时间灌胃不同浓度的药物, 对照组 (Con) 灌胃双蒸水。临床观察发现, 对照组及低剂量组 (L) 小鼠正常采食饮水, 精神活泼, 反应灵敏, 实验过程中未出现死亡情况。中剂量组 (M) 小鼠进食、饮水量与对照组相比下降, 但体质量与对照组小鼠同等上升, 精神正常, 活泼爱动。中高剂量组 (MH)、高剂量组 (H) 小鼠的进食、饮水量、体质量增长曲线均显著低于对照组 (图 1), 并表现出明显的扎堆、被毛凌乱、精神萎靡等临床症状。中高剂量组于实验第 2 日死亡 2 只小鼠, 高剂量组分别于实验第 5 日、第 6 日死亡 2 只、1 只小鼠。

2.2 HE 染色结果分析

图 2 显示, 小鼠处死采样时对照组、低剂量组、中剂量组的肝脏眼观无明显病变, 中高剂量组肝脏颜色较深、质脆, 高剂量组肝脏眼观见梗死灶。为了更进一步观察小鼠的肝脏变化, 我们将小鼠肝脏用甲醛浸泡后石蜡包埋, 切片后采用 HE 染色法通过显微镜观察小鼠肝脏的细微变化。结果显示, 对照组、低剂量组的肝血窦间隙适中、肝细胞排列整齐; 中剂量组小鼠的肝小叶排列正常, 但肝小叶有少量淤血现象; 中高剂量组可见肝脏淤血增多, 同时出现炎性细胞增生; 高剂量组肝脏可见肝细胞排列紊乱、肝血窦间隙增宽。

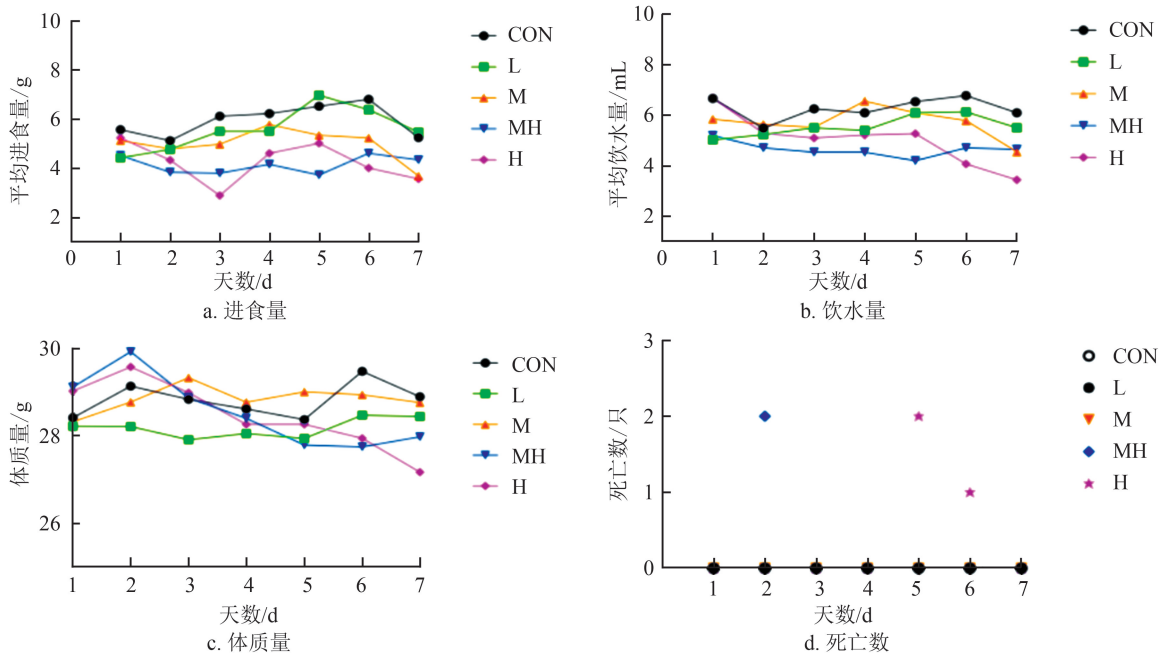


图1 藏药组方毒性实验的临床表现及饮食量、体质量变化情况

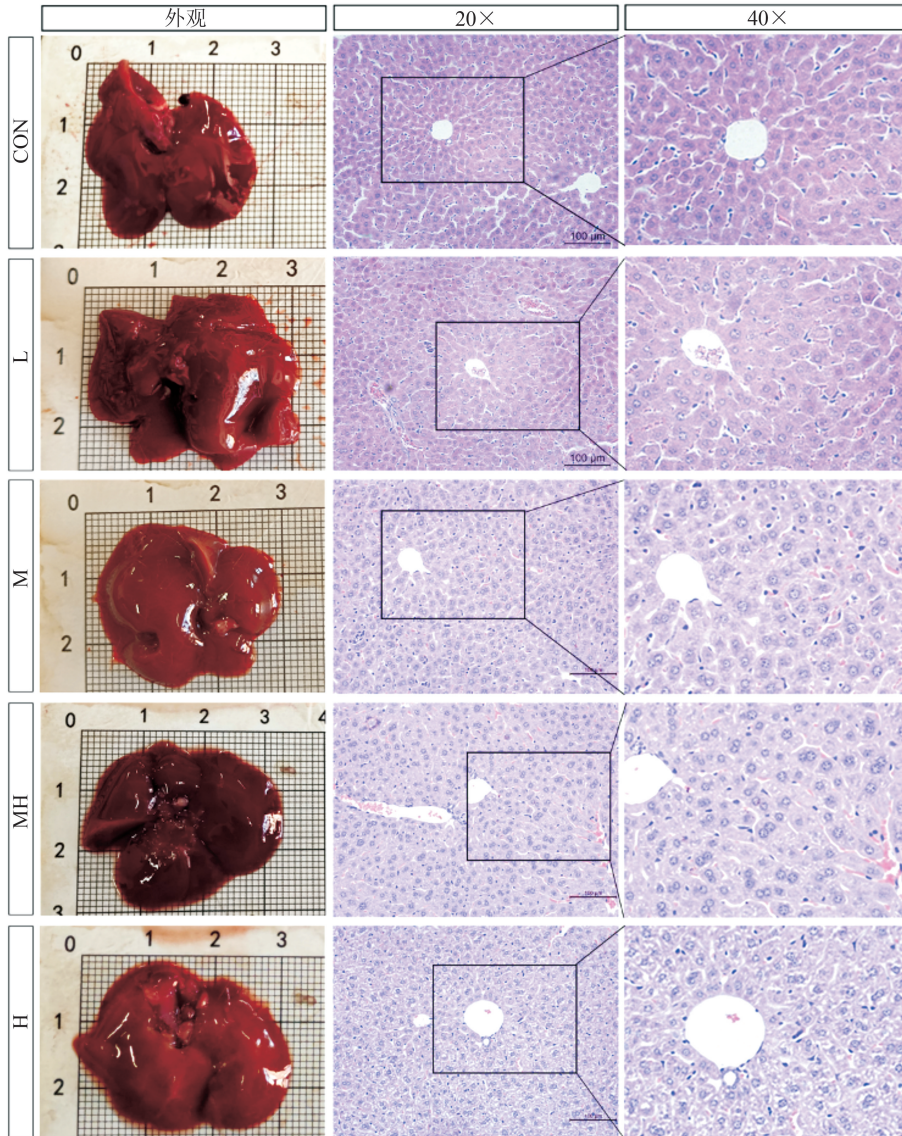


图2 藏药组方毒性实验引起小鼠肝脏组织的病理变化(HE染色)

2.3 实时荧光定量 PCR 实验结果

为了探究高剂量藏药组方水提取物连续 7 d 灌胃小鼠是否会导致肝脏细胞的自噬或凋亡,对小鼠肝脏细胞的相关基因 RNA 进行荧光定量,以探究不同基因在小鼠肝脏细胞中的表达是否发生改变。由图 3 可知,在自噬通路中,*mTOR*、*Atg5*、*LC3b* 基因的 mRNA 表达量与对照组相

比均显著上升($p < 0.05$),*p62*、*Beclin1* 基因的表达量有上升趋势但差异不明显。由图 4 可知,在细胞凋亡通路中,与对照组相比,*CytC* ($p < 0.01$)、*caspase-9* ($p < 0.05$) 基因的 mRNA 表达量显著上升,*caspase-3*、*caspase-8* 基因的表达量上升但差异不明显,*APAF1* 基因的 mRNA 表达量下降但差异也不明显。

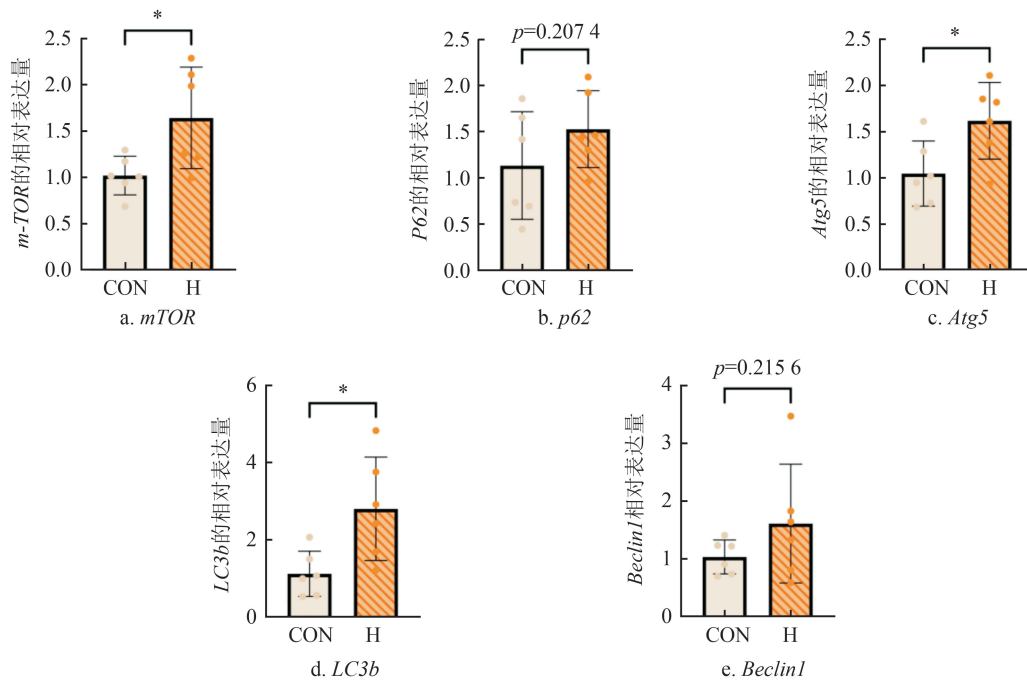


图 3 高剂量藏药组方对小鼠肝脏自噬相关基因的 RNA 表达影响

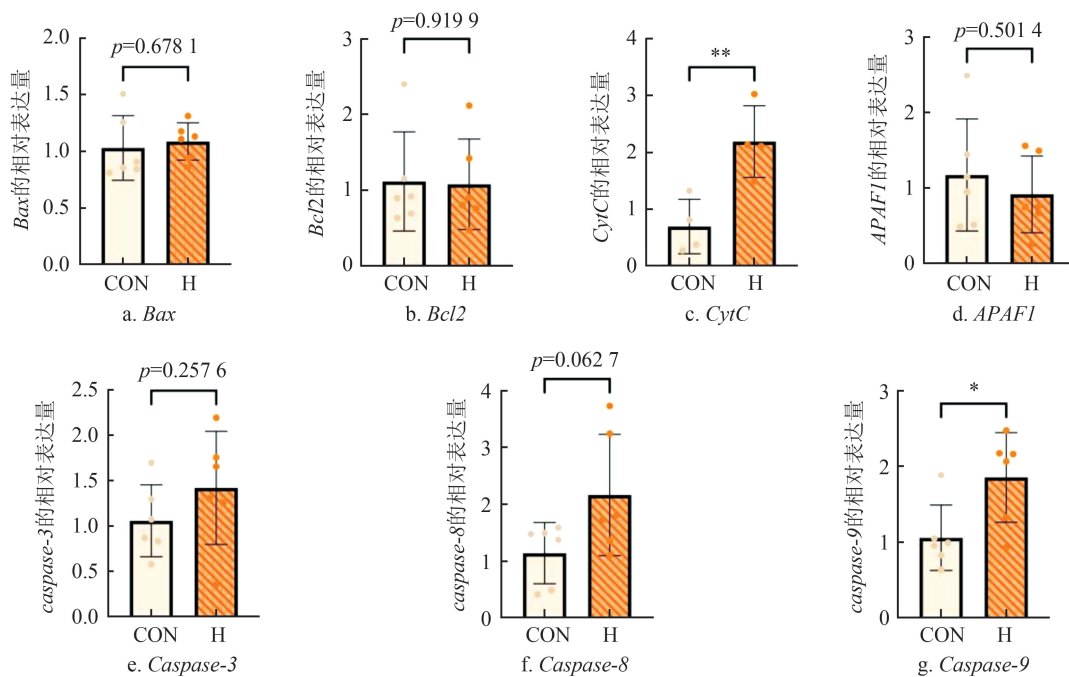


图 4 高剂量藏药组方对小鼠肝脏凋亡相关基因的 RNA 表达影响

2.4 Western blot 实验结果

由图 5 可知,在自噬通路中,*Beclin1* 基因的蛋白表达水平与对照组相比显著上升 ($p < 0.05$),*Atg5*、*LC3b* 基因的蛋白表达水平上升但

差异不显著。由图 6 可知,在细胞凋亡通路中,*Bax*、*CytC*、*caspase-9* 基因的蛋白表达水平均显著上升 ($p < 0.05$),*caspase-8* 基因与对照组相比,其蛋白表达水平上升但差异不明显。

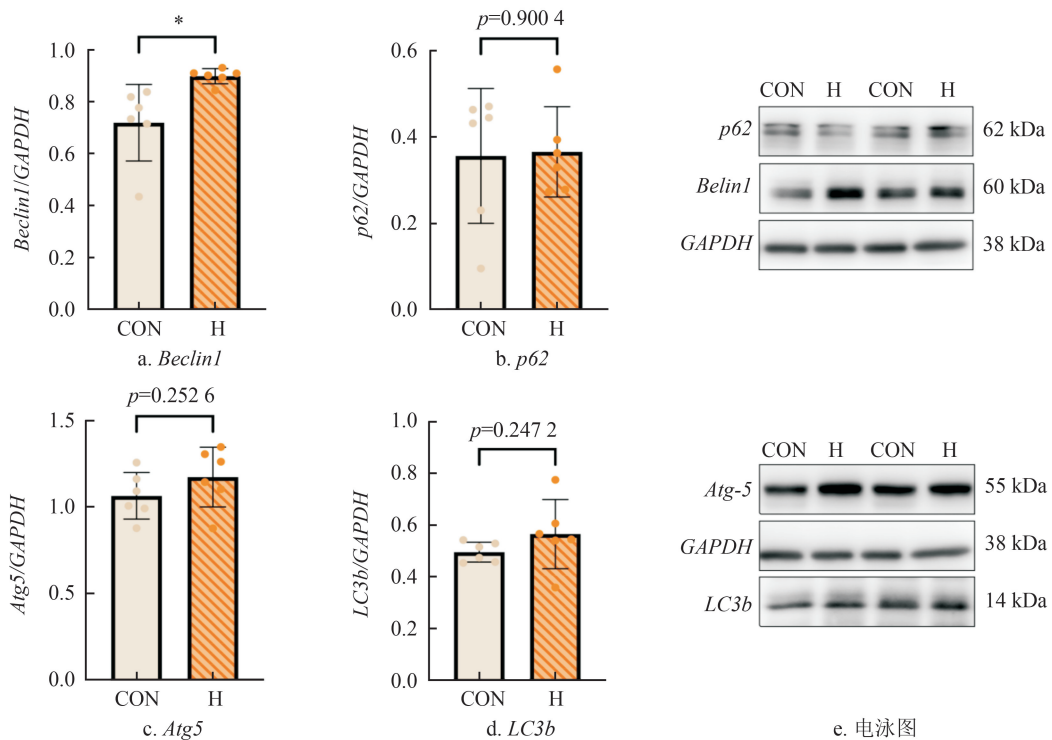


图 5 高剂量藏药组方对小鼠肝脏自噬相关基因的蛋白表达影响

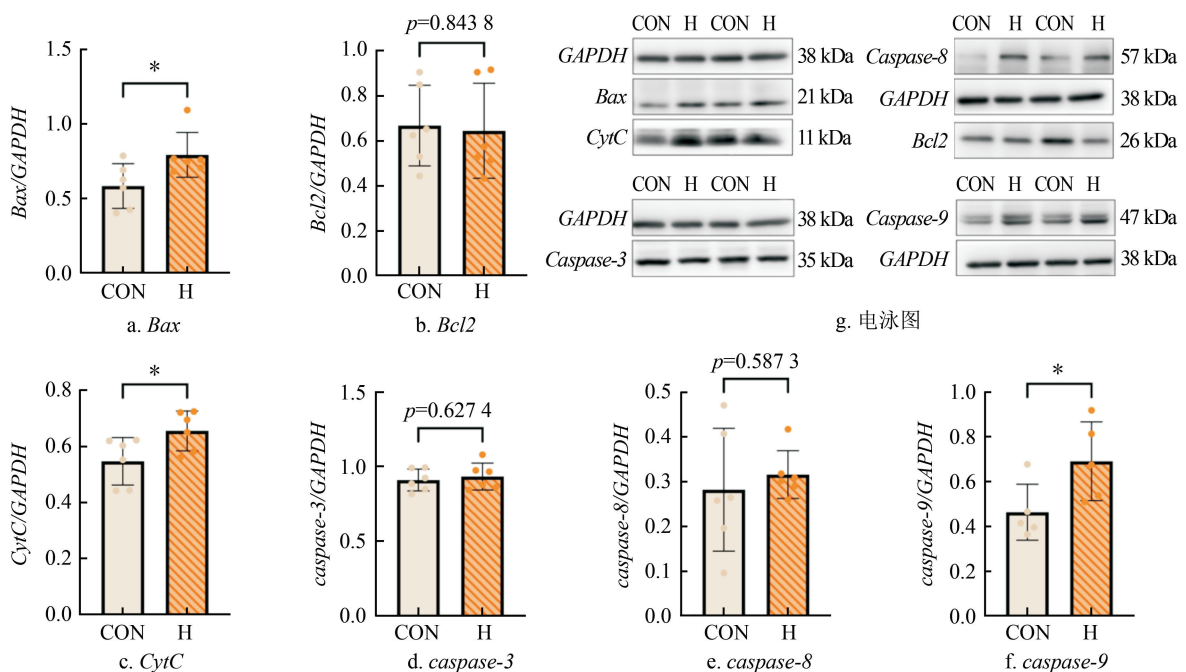


图 6 高剂量藏药组方对小鼠肝脏凋亡相关基因的蛋白表达影响

3 讨论与结论

3.1 讨论

结果表明,本研究用藏药组方的安全性呈

现显著的剂量依赖特征。临床观察显示,低剂量组和对照组小鼠行为及生理指标均处于正常范围,中剂量组的整体精神状态和体质量增长趋势与对照组基本一致,表明该剂量可能接近安全阈

值的临界点。中高剂量组与高剂量组则表现出采食量与饮水量明显降低、体质量增长趋势明显降低,且死亡率随剂量递增而升高。肝脏病理学检查进一步验证了这种剂量依赖特征:随着剂量的增加,肝脏从结构完整、血窦间隙正常,逐步发展为肝小叶淤血、炎性细胞浸润,直至高剂量组出现肝细胞排列紊乱、血窦间隙增宽及肉眼可见的梗死病灶。因而认为本藏药组方在低至中剂量范围内表现出可接受的安全性,而超过则可能诱发明显的肝脏毒性反应,提示在实际应用中需严格把控给药剂量。

肝脏作为药物代谢的关键器官,其损伤机制常涉及细胞稳态的精密调控。自噬与凋亡作为维持细胞稳态的核心生物学过程,在药物性肝损伤的发生发展中起着关键作用。为进一步阐明高剂量藏药组方致肝毒性的分子机制,我们对高剂量组小鼠肝脏组织进行实验,重点分析高剂量组是否通过调控肝脏组织中凋亡与自噬相关通路,进而导致病理学改变。

自噬和凋亡是生物体的基本生命过程,两者相互交织。自噬是细胞降解、回收蛋白质和细胞器以维持细胞内平衡的过程^[26]。自噬是一种降解受损细胞器或蛋白质聚集的细胞过程,最初在肝脏实验中发现。1)自噬通过消除肝脏相关疾病中引入的受损细胞器和蛋白质来保护肝细胞免受损害和细胞死亡;2)自噬在不同的条件下可以促进肝损伤的进一步恶化^[27]。*mTOR* 是细胞代谢的主调节剂,它存在于 *mTORC1*、*mTORC2* 两个不同的复合物中。研究表明,*mTOR* 的上升会抑制自噬,而 *mTOR* 的下降会激活自噬^[28]。由于 *mTOR* 信号在驱动自噬中的关键调节作用,我们对其表达水平进行了检测。在实验中,我们发现高剂量组的小鼠肝脏细胞 *mTOR* 的 RNA 表达量显著上升 ($p < 0.05$),由此推测,小鼠肝脏细胞的自噬正在受到抑制。基于此,我们还对自噬相关基因 *p62*、*Atg5*、*LC3b*、*Beclin1* 基因的 RNA 和蛋白表达水平进行了检测。自噬-溶酶体过程调控着细胞的稳态,*p62* (SQSTM1) 已被确定为泛素化蛋白受体。*p62* 选择性地将泛素化蛋白质转移到自噬囊泡中,并在溶酶体中降解^[29],这一过程需要自噬标记蛋白 LC3b 的参与^[30]。在哺乳动物中,LC3 是一种重要的自噬标记蛋白,类似于酵母中的 *Atg8*。LC3 在 -COOH

末端被裂解为细胞质 LC3-I,而后被转化为 LC3-II,后者通过磷脂酰乙醇胺与自噬体膜紧密结合^[31]。*p62* 直接与 LC3 结合,最终被自噬特异性降解^[32]。而自噬囊泡的产生需要 *Atg5*, *Atg5-ATG12-ATG16* 复合物是一种类似泛素的结合体,有助于脱落膜的伸长和自噬体的成熟^[30]。本研究表明,高剂量组小鼠肝脏 *p62*、*Atg5*、*LC3b*、*Beclin1* 基因的 RNA 和蛋白表达水平均呈现上升趋势,其中 *Atg5*、*LC3b* 基因的 RNA 表达水平上升显著 ($p < 0.05$)。根据实验结果,我们认为高剂量组会对小鼠肝脏造成损伤,影响自噬相关基因的表达,但其并不调控肝脏细胞的自噬激活或自噬抑制。

作为对外界刺激的细胞应激反应,细胞凋亡是程序性细胞死亡的一种调节形式,在多细胞生物体生命周期中至关重要^[33]。细胞凋亡可以有效地清除受损细胞,其机制涉及多种信号通路,十分复杂。细胞凋亡包括外源性细胞凋亡途径和内在细胞凋亡途径。在外源性细胞凋亡途径中,肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 超家族在其中起着重要作用^[34],其是暴露在细胞表面的死亡受体,称为死亡结构域 (DD),与细胞凋亡信号密切相关。内在细胞凋亡途径具有很强的线粒体依赖性,通常是由内部刺激导致启动,如缺氧和严重的氧化应激可诱导细胞凋亡^[35]。*Bcl2* 家族在内在细胞凋亡途径中扮演着重要角色,其通过疏水跨膜螺旋附着在线粒体外膜上,被称为释放细胞凋亡因子的“看门人”^[36]。*Bcl2* 家族促凋亡基因的活化会导致抗凋亡基因 *Bcl2*、*Bcl-xL* 等被抑制,导致线粒体膜外膜被破坏,这是细胞凋亡程序的第一步。抗凋亡基因 *Bcl2* 和促凋亡基因 *Bax* 是细胞凋亡程序的经典基因,他们在线粒体凋亡途径中起着重要作用。当 *Bcl2* 的表达减少而 *Bax* 上升时,表明凋亡程序正在被促进,线粒体外膜被破坏,其中的蛋白质会扩散到细胞质中,包括 *CytC* (细胞色素 C) 等细胞凋亡因子,进而在细胞质中形成细胞凋亡体^[37]。Chen 等^[38] 的研究表明,小鼠吸入氨气后,通过下调 *Bcl2* 及上调 *Bax* 的表达量来促进肝脏细胞的凋亡。基于 *Bcl2* 与 *Bax* 在线粒体凋亡途径中的重要性,我们对二者在高剂量组小鼠肝脏中的表达进行了研究。qRT-PCR 和 Western blot 实验结果均显示,促凋亡基因 *Bax* 显著上升 ($p < 0.05$),

RNA 表达水平上升但不显著。在对抗凋亡基因 *Bcl2* 检测时发现, *Bcl2* 的蛋白表达水平有下降趋势, 由此推测, 高剂量组可能会激活小鼠肝脏细胞凋亡程序以清除受损肝脏细胞。为了验证小鼠肝脏细胞的凋亡程序被启动, 我们对 *CytC* 基因的表达进行了检测, 结果发现 *CytC* 的 RNA 表达水平上升趋势十分显著 ($p < 0.01$), 其蛋白表达水平也较显著 ($p < 0.05$), 由此得出: 高剂量组小鼠肝脏细胞的凋亡程序已经被启动, 线粒体外膜受到破坏, 导致细胞凋亡因子漏出。研究表明, *CytC* 会与 *APF1* (凋亡蛋白酶激活剂 1) 和活化的 *caspase-9* 结合形成凋亡小体, 凋亡小体可以促进 *caspase-3* 的激活并最终导致凋亡^[33]。为了验证小鼠肝脏细胞的凋亡程序启动后是否形成凋亡小体, 我们再对 *APAF1* 基因进行了检测, 结果未有明显上升或下降趋势。研究表明, 细胞凋亡体可激活 *caspase-9*, *caspase-9* 是 *caspases* 家族的启动子之一, 细胞凋亡程序主要由 *caspases* 家族执行。在细胞凋亡程序中, *caspases* 家族是细胞凋亡机制的核心^[39], 它们既是细胞死亡的启动者 (如 *caspase-8* 和 *caspase-9*), 又是细胞死亡的执行者 (如 *caspase-3* 和 *caspase-7*)。 *caspase-9* 的加入可以激活细胞的凋亡程序, *caspase* 家族的执行者也会同时被 *caspase-9* 激活, 以裂解细胞底物, 导致细胞凋亡。因此我们对 *caspases* 家族的启动者 *caspase-8*, *caspase-9* 和执行者 *caspase-3* 进行检测, 结果表明, *caspase-9* 的 RNA 表达水平和蛋白表达水平均有显著的上升趋势 ($p < 0.05$), *caspase-8* 的 RNA 表达水平和蛋白表达水平上升但不具有显著性。由此推测, 高剂量组小鼠的肝脏细胞的凋亡程序启动, 细胞凋亡因子 *CytC* 漏出, 细胞凋亡体形成, 形成的凋亡小体激活细胞凋亡启动子 *caspase-9*, 细胞开始凋亡。凋亡蛋白酶激活剂 *APAF1* 没有明显上升趋势, 我们推测, *CytC* 可能与其他因子结合形成了细胞凋亡体, 共同完成细胞的凋亡程序。细胞凋亡启动子 *caspase-9* 的上升趋势显著而 *caspase-3* 未呈现出明显的上升趋势, 表明细胞的凋亡程序开始, 但凋亡程序是否被终止或由其他基因继续执行, 还值得更多的研究来探讨。

3.2 结论

在治疗牦牛腹泻的藏药组方毒性实验中, 小

鼠处死采样时低剂量组、中剂量组的肝脏肉眼无明显病变, 中高剂量组和高剂量组可见明显肝脏病变。通过对病变最严重的高剂量组进行 qRT-PCR 和 Western blot 检测小鼠肝脏的自噬、凋亡相关基因的表达, 发现高剂量组可显著上调自噬相关基因 (如 *Atg5*、*LC3b*) 的表达, 但并不直接激活或抑制自噬通路; 同时, 高剂量组能够启动线粒体凋亡途径, 表现为 *CytC* 释放及 *caspase-9* 显著激活, 提示其通过诱导线粒体依赖性凋亡途径导致肝脏损伤。因此, 我们认为每 10 g 小鼠藏药剂量 20 mg、100 mg 对其肝脏没有明显毒性作用, 可用于后续藏药组方治疗牦牛腹泻的临床参考剂量。

参考文献:

- [1] 布琼次仁. 西藏牦牛犊牛腹泻病因及防治[J]. 四川畜牧兽医, 2024, 51(11): 52-55.
- [2] 张小娟, 赵智轩, 普布潘多, 等. 中草药在牦牛健康养殖中应用的研究进展[J]. 养殖与饲料, 2025, 24(1): 22-27.
- [3] 更桑多杰. 牦牛犊牛腹泻病因及防控措施[J/OL]. 畜牧兽医科学(电子版), 2022(21): 120-122.
- [4] BERCHTOLD J. Treatment of calf diarrhea: intravenous fluid therapy[J]. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 2009, 25(1): 73-99.
- [5] 徐长辉. 散养牦牛腹泻性疫病防治方法[J]. 中兽医学杂志, 2022(7): 40-41.
- [6] 杨文斌, 虎文蓉, 何顺福, 等. 一例牦牛急性胃肠炎的诊治[J]. 甘肃畜牧兽医, 2024, 54(1): 28-32.
- [7] 常振宇, 董海龙, 叶炳涛, 等. 乳酸杆菌对牦牛大肠黏膜屏障的保护作用及 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2024(11): 62-66.
- [8] 次仁旺堆, 洛桑次仁. 藏兽医角度下犊牛腹泻的病因分析及防治[J]. 畜牧业环境, 2024(23): 100-101.
- [9] 李登宇, 李天娇, 班马泽郎, 等. 中藏药对西藏牦牛源沙门氏菌抑菌效果研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023(17): 72-77.
- [10] 朱文静, 周雁南, 李昊, 等. 藏药九味防瘟散抗菌抗炎作用研究[J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2024, 45(4): 85-93.
- [11] 陈丽萍, 王荣, 刘菲菲. 中藏药防治高原低氧脑损伤作用及机制研究进展[J]. 甘肃中医药大学学报, 2024, 41(6): 68-76.
- [12] 喻伟, 张义红, 李振宇, 等. 空降兵进入高原地区应用麝香保心丸预防高原反应初探[J]. 中华保健医学杂志, 2012, 14(4): 301-303.
- [13] ZHANG Z, LI X Y, LI C L, et al. Effect of berberine

- on LPS-induced expression of NF- κ B/MAPK signaling pathway and related inflammatory cytokines in porcine intestinal epithelial cells[J]. *Innate Immunity*, 2020, 26(7): 627-634.
- [14] 张静, 范亭莉, 刘爱菊. 黄连提取物对仔猪生长性能及肠道形态的影响[J]. *中国饲料*, 2024(22): 41-44.
- [15] 张晓涵, 孙岚源, 宋转, 等. 诃子提取物对脂多糖刺激肉鸡肠道和肝脏损伤的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2024, 51(8): 3267-3278.
- [16] 冯玉树. 五倍子联合诃子提取物对牛源奇异变形杆菌致小鼠腹泻的疗效研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2023.
- [17] 杨敏杰, 刘伟, 涂宏飞, 等. 藏红花素保护溃疡性结肠炎模型大鼠的作用及相关机制[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(29): 4673-4679.
- [18] 王妍, 佟雷, 张静, 等. 红花多糖对菌群失调小鼠肠道菌群及细胞因子的影响[J]. *牡丹江医学院学报*, 2023, 44(2): 17-19.
- [19] 贡保草, 更登昂毛, 才让三知, 等. 藏药拉孜(麝香)的本草考证[J]. *中国药学杂志*, 2025, 60(12): 1313-1322.
- [20] 徐建东. 麝香痔疮栓联合软膏治疗肛肠病的临床观察[J]. *大医生*, 2019, 4(1): 64-65.
- [21] LIU Z, HE X, WANG L L, et al. Chinese herbal medicine hepatotoxicity: the evaluation and recognition based on large-scale evidence database [J]. *Current Drug Metabolism*, 2019, 20(2): 138-146.
- [22] KUBES P, JENNE C. Immune responses in the liver[J]. *Annual Review of Immunology*, 2018, 36: 247-277.
- [23] CALITZ C, DU PLESSIS L, GOUWS C, et al. Herbal hepatotoxicity: current status, examples, and challenges[J]. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2015, 11(10): 1551-1565.
- [24] 王晓萌, 林晓兰, 张鹏. 38例何首乌致肝损害的原因分析[J]. *北京中医药*, 2014, 33(9): 699-701.
- [25] 朱云, 李永纲, 王夔, 等. 595例中药导致肝损伤临床特征分析[J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(1): 44-48.
- [26] LIU S Z, YAO S J, YANG H, et al. Autophagy: regulator of cell death[J]. *Cell Death & Disease*, 2023, 14: 648.
- [27] WANG H J, LIU Y M, WANG D M, et al. The upstream pathway of mTOR-mediated autophagy in liver diseases[J]. *Cells*, 2019, 8(12): 1597.
- [28] CODOGNO P, MEIJER A J. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2005, 12(2): 1509-1518.
- [29] PANKIV S, CLAUSEN T H, LAMARK T, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(33): 24131-24145.
- [30] YE X, ZHOU X J, ZHANG H. Exploring the role of autophagy-related gene 5 (ATG5) yields important insights into autophagy in autoimmune/autoinflammatory diseases[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 2334.
- [31] KABEYA Y, MIZUSHIMA N, UENO T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing[J]. *The EMBO Journal*, 2000, 19(21): 5720-5728.
- [32] KOMATSU M, WAGURI S, KOIKE M, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice[J]. *Cell*, 2007, 131(6): 1149-1163.
- [33] WU S Y, WANG Y J, IQBAL M, et al. Challenges of fluoride pollution in environment: mechanisms and pathological significance of toxicity: A review[J]. *Environmental Pollution*, 2022, 304: 119241.
- [34] FULDA S, DEBATIN K M. Death receptor signaling in cancer therapy[J]. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 2003, 3(4): 253-262.
- [35] ESPOSTI M D, DIVE C. Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 304(3): 455-461.
- [36] CORY S, ADAMS J M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2002, 2(9): 647-656.
- [37] PISTRITTO G, TRISCIUOGLIO D, CECI C, et al. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies[J]. *Aging*, 2016, 8(4): 603-619.
- [38] CHEN B H, LIU X Q, WU S Y, et al. Inhalation of ammonia promotes apoptosis and induces autophagy in hepatocytes *via* Bax/Bcl-2 and m-TOR/ATG5/LC-3b II axes[J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 912: 169036.
- [39] SHI Y G. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis[J]. *Molecular Cell*, 2002, 9(3): 459-470.