

· 药物代谢 ·

甘遂-甘草配伍对大鼠肾脏毒性代谢组学的影响

唐冰雯¹, 李俊健², 毋福海², 宋粉云^{2*}

(1. 广州医科大学 卫生职业技术学院, 广州 510180; 2. 广东药学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**根据传统用药习惯,从代谢组学的角度来验证甘遂-甘草以1:4比例配比时对大鼠肾脏的减毒作用,并在此基础上初步探讨其减毒作用机制。**方法:**实验采用SD雄性大鼠,随机分为空白对照组,甘遂组,甘草组和甘遂-甘草1:4组。应用核磁共振技术(NMR)和正交-偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)方法分析给予大鼠甘遂、甘草和甘遂-甘草1:4配比液后的大鼠肾脏代谢物变化,并结合血浆生化分析和肾脏组织病理切片HE染色检测,明确甘遂-甘草1:4配伍的减毒作用机制。**结果:**甘草组极少引起血浆生化指标和病理学改变,同时对大鼠肾脏内源性代谢物的变化不大;甘遂组能引起血浆葡萄糖的升高和肌酸、肌酐的下降,造成肾小管上皮细胞水肿和空泡变性,肾小球个别出现瘀血的现象,同时引起肾脏内源性代谢物如胆碱,磷酸胆碱,苯丙氨酸,谷氨酰胺的减少和异亮氨酸,亮氨酸,缬氨酸,丙氨酸,乙酸,肌酸/肌酐的增加;而甘遂-甘草1:4组并未出现明显的血浆生化指标改变,仅出现肾小球轻微瘀血及肾小管上皮细胞扩张的现象,同时仅引起胆碱,磷酸胆碱和苯丙氨酸的减少。**结论:**甘遂-甘草以1:4配伍存在明显的减毒作用,主要是通过甘遂毒性生物标志物含量的变化和肾脏毒性传统指标的下调来体现其减毒效应。

[关键词] 甘遂; 甘草; 配伍; 代谢组学; 核磁共振

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)09-0088-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015090088

Effect of Kansui Radix Combining with Glycyrrhizae Radix et Rhizoma in Rat's Kidney by Metabonomics

TANG Bing-wen¹, LI Jun-jian², WU Fu-hai², SONG Fen-yun^{2*} (1. Vocational College of Health, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510180, China; 2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** In this study, we investigated the impact of combining Kansui Radix with Glycyrrhizae Radix et Rhizoma (1:4) on the kidney in rats. On this basis, the mechanism of the reducing toxicity was also studied. **Method:** Male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assign to four groups, which were controls, Kansui Radix, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma and Kansui Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma (1:4). The kidney extract metabonomic analyses of Kansui Radix, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma and Kansui Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma (1:4) was used by NMR and OPLS-DA. Clinical biochemical and histopathological assessments were also performed. **Result:** All the clinical biochemical, histopathological and metabolites results were no significant change in Glycyrrhizae Radix et Rhizoma treated rats. Not only the increased glucose and decreased creatine/creatinine in plasma, but also the renal tubular epithelial cell swelling and vacuoles degeneration, glomerular blood clot were observed in Kansui Radix treated rats. Besides, decreased choline, phosphorylcholine, phenylalanine and glutamine, increased isoleucine, leucine, alanine, valine, acetic acid, creatine/creatinine was observed in Kansui Radix treated rats. In Kansui Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma (1:4) treatment group, there was no significant change in plasma index. The histopathological changes was only the glomerular congestion and renal tubular epithelial cells expansion. The variations were only declined of choline,

[收稿日期] 20140831(003)

[基金项目] 广州医学院青年基金项目(2012A02)

[第一作者] 唐冰雯, 硕士, 从事代谢组学在药物分析中的应用研究, Tel:13560043051, E-mail:tbw113@163.com

[通讯作者] * 宋粉云, 硕士, 教授, 从事药物分析研究, Tel:13660528126, E-mail:songfenyun2011@163.com

phosphorylcholine and phenylalanine in Kansui Radix. **Conclusion:** Detoxification of Kansui Radix in kidney by combining with Glycyrrhizae Radix et Rhizoma was obvious. It could be owing to the intervention of the biomarker of Kansui Radix and down regulation of the traditional indicator of kidney lesion.

[**Key words**] Kansui Radix; Glycyrrhizae Radix et Rhizoma; combination; metabonomics; NMR

甘遂收载于《中国药典》2010年版一部,为毒性中药之一^[1-2],性寒,味苦,有毒,归肺、肾、大肠经,具有泻水逐饮的功能,被誉为“泄水圣药”。此外,甘遂还具有抗肿瘤和抗白血病作用等^[3]生物活性。但是,甘遂具有刺激肠道,损害心、肝、肾等脏器^[4]的毒性作用。针对甘遂的毒性作用,古人常采用甘草-甘遂配伍使用来减轻甘遂毒性,如张仲景的《金匮要略》中设甘遂半夏汤,使甘遂与甘草同用^[5]。但是甘草-甘遂同时又是中药“十八反”中的首列禁忌。针对该问题,现有研究从传统毒理学改变或是经典毒性指标的角度来阐述不同甘遂-甘草配比对大鼠心、肝、肾或肠功能的影响^[6],但均未能系统的说明引起这些作用的原因。代谢组学作为一门新的“组学”,能够全面监测机体代谢物的变化。它的整体性和系统性更符合中药成分复杂,多靶点交叉作用的特点,因此被广泛应用于中药物质基础和毒副作用等方面的研究。国内现有的甘遂毒性代谢组学研究一般仅对甘遂毒性作用或醋制甘遂减毒作用进行研究^[4,7-8],并未考评甘遂-甘草配伍减毒等相关问题。在利用代谢组学方法明确了甘遂的肝肾毒性的基础上^[4,5,7],本实验首次采用代谢组学的方法,对甘遂,甘草及甘遂-甘草(1:4)引起大鼠肾脏内源性代谢物进行分析,整体验证和评价甘遂-甘草(1:4)的减毒作用。

1 材料

1.1 药材 本实验所用中药甘遂和甘草购自广东省广州市清平药材市场,并由广东药学院中药学院刘基柱副教授鉴定,证实其为大戟科植物甘遂 *Euphorbia kansui* 的干燥块根和豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 干燥根和根茎。

1.2 动物 SD大鼠,SPF级,雄性,购自广东省医学实验动物中心,体重180~220 g,合格证号 SCXK(粤)2008-0002。动物饲养于广东药学院实验动物中心,常规喂养,自由饮水,饲养室光照10 h,黑暗14 h,室温(25±1)℃,相对湿度35%~75%。

1.3 试剂 乙腈(CH₃CN),磷酸二氢钠(NaH₂PO₄),磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)等均为国产分析纯。重水(D₂O)和含TSP的重水购自青岛腾龙科技有限公司。

1.4 仪器 AVANCE III 500 MHz型超导液体NMR仪(Bruker),DL-360型超声波清洗器[宁波石浦海天电子仪器厂,频率(4.5±0.225)kHz,功率240 W],CX5型自动生化分析仪(美国Beckman),KL512型氮吹仪(金坛市盛蓝仪器制造有限公司),ZH-2-BLENDER型震荡器(天津药典标准仪器制造厂),TGL-16G型台式高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。

2 方法

2.1 甘遂、甘草水提取液的制备

2.1.1 甘遂水提取液的制备 称取甘遂600 g,洗净,加水3 600 mL,煎煮至沸腾后30 min,过滤,残渣加水2 400 mL,煎煮至沸腾后20 min,合并滤液,浓缩至600 mL,甘遂水提取液的质量浓度1 g·mL⁻¹。置于4℃条件下保存,备用。

2.1.2 甘草水提取液的制备 称取甘草600 g,洗净,加水3 600 mL,煎煮至沸腾后30 min,过滤,残渣加水2 400 mL,煎煮至沸腾后20 min,合并滤液,浓缩至600 mL,甘草水提取液的质量浓度1 g·mL⁻¹。置于4℃条件下保存,备用。

2.1.3 甘遂-甘草(1:4)水提取液的制备 称取甘遂600 g和甘草2 400 g,洗净,加水18 000 mL,煎煮至沸腾后30 min,过滤,残渣加水12 000 mL,煎煮至沸腾后20 min,合并滤液,浓缩至1 500 mL,则甘遂-甘草(1:4)水提取液的总药物质量浓度2 g·mL⁻¹。置于4℃条件下保存,备用。

2.2 动物分组和给药剂量 48只雄性大鼠,体重为180~220 g,随机分为4个实验组,大鼠自由饮水、摄取食物。经过适应饲养1周后,每天ig给药1次。其中A组给予纯净水,为空白组;B组为给予15.75 g·kg⁻¹甘遂组;C组为给予15.75 g·kg⁻¹甘草组;D组为给予78.75 g·kg⁻¹甘遂-甘草(1:4)组。给药14 d后,随机取每个实验组中的6只大鼠,收集血浆,于低温冰箱保存。取血后处死大鼠,收集肾脏,于低温冰箱保存。每个实验组中剩下的6只大鼠进行停药7 d的恢复期实验。

2.3 血浆生化分析和组织病理学检查 取给予甘遂14 d收集的大鼠血浆进行14 000×g低温离心10 min处理,利用Beckman DXC 800全自动血浆生

化分析仪测定血浆中葡萄糖 (GLU), 尿素氮 (BUN), 肌酐 (CREA) 3 个指标。测定的结果采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析。

取肾脏部分组织进行 4% 的甲醛固定、组织修切、石蜡包埋、常规切片、HE 染色、乙醇梯度脱水、透明、封片和光学显微镜观察。

2.4 肾脏的处理 取肾脏组织适量, 约为 50 mg, 加液氮将其研磨成粉末, 加入 1 mL 50% 的乙腈-水进行研磨提取 10 min, 移取提取液至离心管中, 15 000 × g 离心 10 min 后, 取上清, 备用; 沉淀再次加入 1 mL 50% 的乙腈-水研磨提取 10 min, 15 000 × g 离心 10 min, 取上清, 并将 2 次离心的上清液混合。氮吹仪吹干后进行冷冻干燥, 取冻干粉加入 600 μL 磷酸缓冲液 (0.2 mol · L⁻¹ Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.4), 15 000 × g 低温离心 10 min, 取上清, 加入 100 μL 的含 TSP 的重水, 转入 5 nm 核磁管。混匀, 于 4 °C 冰箱保存, 备用。

2.5 肾脏提取物的 NMR 数据采集 肾脏提取物测定使用 Bruker AVANCE III 500 MHz 超低温探头核磁共振仪, 调用预饱和的 NOESY (recycle delay-G₁-90 °C-t1-90 °C-G₂-tm-90 °C-acquisition) 脉冲序列。NMR 测定相关参数如下: 循环间隔 2 s, 谱宽 10 000 Hz, 采样点数 64 k, 叠加次数 64 次, 循环次数 64 次, 控制温度在 298 K。自由感应衰减信号经过 32 k 傅立叶变换转为 NMR 谱图。将图谱文件夹导入 MestReNova 2.0, 以 TSP 为化学位移参考峰的位置, 设为 δ 0, 校正化学位移, 对图谱进行相位校正和基线校正和自动积分 (区间 δ 0.5 ~ 9.0, 间隔 0.005 ppm)。为了消除剩余水峰的影响, 将积分区间 δ 4.7 ~ 5.1 的积分值设为零。所有积分数据进行归一化处理, 以

Excel 文件格式保存, 用于进行模拟识别分析。

2.6 模式识别分析 将归一化后的数值导入 SIMCA-P⁺ 12.0 软件 (Umetrics, Sweden) 进行 OPLS-DA 的模式识别分析。

3 结果

3.1 大鼠血浆的生化分析和病理切片 虽然生化分析的结果没有引起各项指标的显著性变化, 但是甘遂组与空白组相比, 仍能够引起 GLU 的降低, BUN 和 CREA 的增加。而甘遂-甘草 (1:4) 组对各生化指标的影响较甘遂要小, 故甘遂-甘草 (1:4) 组可降低甘遂的毒性, 见表 1。

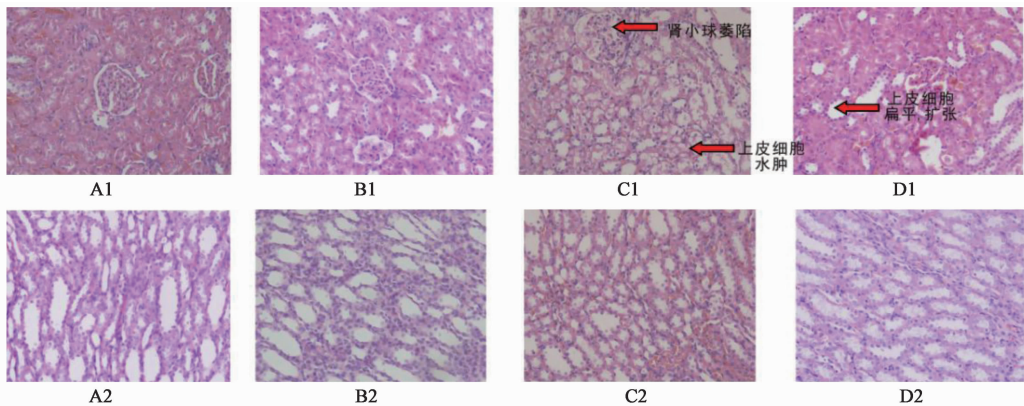
表 1 甘遂-甘草给药大鼠血浆生化分析的结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Summary of plasma clinical chemistry parameters at day 14 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g · kg ⁻¹	GLU	BUN	CREA
		/mmol · L ⁻¹	/mmol · L ⁻¹	/mol · L ⁻¹
空白	-	9.11 ± 1.95	6.14 ± 1.17	23.80 ± 1.10
甘草	15.75	9.04 ± 1.35	6.17 ± 1.21	23.20 ± 3.57
甘遂	15.75	8.17 ± 1.63	6.22 ± 1.02	24.40 ± 3.85
甘遂-甘草	78.75	8.75 ± 1.02	6.28 ± 1.62	24.00 ± 4.84

肾组织的病理学检验结果, 见图 1。对照组大鼠的肾小球结构正常, 未有细胞增生、变质及渗出性改变的情况; 肾小管结构完整, 未见上皮细胞水肿及变性; 甘草组大鼠肾小管及肾小球未出现病理学改变; 甘遂组大鼠有肾小管上皮细胞明显水肿, 空泡变性, 个别肾小球有瘀血, 个别肾小球毛细血管萎陷; 甘遂-甘草 (1:4) 组大鼠肾小球有轻微瘀血, 肾小管上皮细胞扁平扩张。

3.2 大鼠肾脏提取物的¹H-NMR 图谱 根据 COSY, TOCSY, HSQC 二维 NMR 谱和查阅相关文献 [16-17] 对连续给予药物 14 d 后, 各组肾脏提取



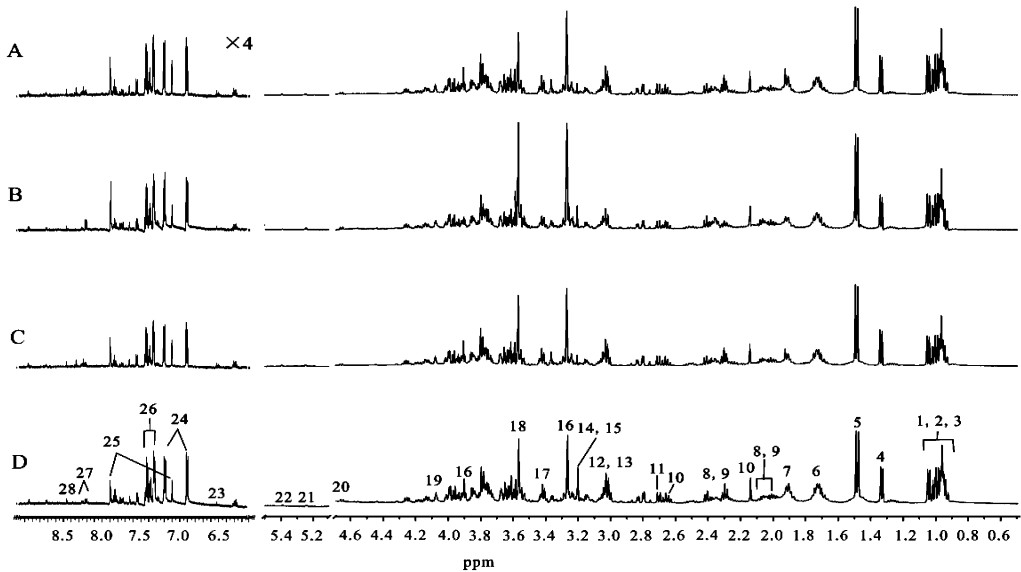
A1. 空白组大鼠肾皮质; A2. 对照组大鼠肾髓质; B1. 甘草组大鼠肾皮质; B2. 甘草组大鼠肾髓质; C1. 甘遂组大鼠肾皮质; C2. 甘遂组大鼠肾髓质; D1. 甘遂-甘草 (1:4) 组大鼠肾皮质; D2. 甘遂-甘草 (1:4) 组大鼠肾髓质

图 1 大鼠肾脏组织病理切片 (HE, ×400)

Fig. 1 Histopathology of kidney tissue at day 14 (HE, ×400)

物¹H-NMR 图谱中的各代谢物进行峰归属,见图 2。大鼠肾脏提取物中主要有氨基酸(亮氨酸,异亮氨酸,缬氨酸等)、乳酸、葡萄糖和丙氨酸等,还可以观

察到芳香族氨基酸和胆碱,甜菜碱等胆碱代谢物。为了深入了解大鼠肾脏提取物中代谢物的变化情况,进一步进行模式识别分析。



A. 甘遂-甘草 1:4 组; B. 甘遂组; C. 甘草组; D. 空白; 1. 异亮氨酸; 2. 亮氨酸; 3. 缬氨酸; 4. 乳酸; 5. 丙氨酸; 6. 赖氨酸; 7. 乙酸; 8. 谷氨酸; 9. 谷氨酰胺; 10. 蛋氨酸; 11. 二甲胺; 12. 肌酸; 13. 肌酐; 14. 胆碱; 15. 磷酸胆碱; 16. 甜菜碱; 17. 牛磺酸; 18. 甘氨酸; 19. 肌醇; 20. β -葡萄糖; 21. α -葡萄糖; 22. 尿素; 23. 延胡索酸; 24. 酪氨酸; 25. 组氨酸; 26. 苯丙氨酸; 27. 肌苷; 28. 甲酸

图 2 给予药物 14 d 空白组,甘遂组,甘草组和甘遂-甘草(1:4)组大鼠肾脏提取物典型核磁(δ 6.0 ~ 9.0, $\times 4$)

Fig. 2 Representative kidney extracts ¹H-NMR spectra from control, Kansui Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma 1:4 treated rats at day 14 (δ 6.0 ~ 9.0, $\times 4$)

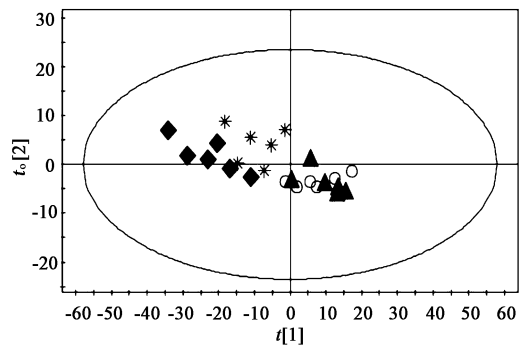
3.3 肾脏提取物代谢产物谱的毒效 OPLS-DA 分析

对连续给药 14 d,空白组,甘草组,甘遂组,甘遂-甘草(1:4)组的大鼠肾脏提取液¹H-NMR 谱积分数据进行 OPLS-DA 分析,见图 3。结果显示空白组与甘草组的分组差异并不明显。但是空白组与甘遂组和甘遂-甘草 1:4 组之间的积分值均远离互不重叠,表明各组大鼠肾脏代谢物存在差别。在此基础上,进一步结合 OPLS-DA 分析的 correlation coefficient-loading 相关图,见图 4。发现与空白组相比,甘草组并没有引起内源性代谢物的显著变化;甘遂组却能引起胆碱,胆碱,磷酸胆碱,苯丙氨酸,谷氨酰胺的减少和异亮氨酸,亮氨酸,缬氨酸,丙氨酸,乙酸,肌酸/肌酐的增加。但甘遂-甘草(1:4)组仅引起胆碱,磷酸胆碱和苯丙氨酸的减少。由此说明甘遂-甘草(1:4)组能够明显减少甘遂组所引起的大鼠肾脏内源性代谢物变化种类和数量,以此发挥甘遂-甘草(1:4)配伍减毒的作用。

4 讨论

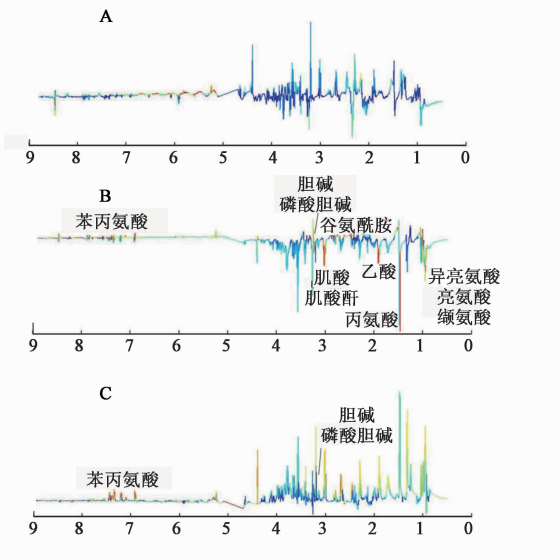
根据笔者的前期研究^[4,7-8],发现甘遂能引起尿液中支链氨基酸含量增加,并且干扰机体内氨基酸,

糖类物质的代谢途径,从而引起肾脏的代谢和功能紊乱^[9]。且在甘遂毒性的血浆代谢组学研究中也表明甘遂可引起机体能量代谢、氨基酸代谢和脂代谢紊乱。在本实验中,甘遂组引起肾脏提取物中异亮氨酸,亮氨酸,缬氨酸,丙氨酸等支链氨基酸的增



○. 空白组; ▲. 甘草组; ◆. 甘遂组; *. 甘遂-甘草(1:4)组
图 3 给予药物第 14 天 4 组大鼠肾脏的 OPLS-DA 分析 ($R^2 = 84.3\%$, $Q^2 = 79.1\%$)

Fig. 3 OPLS-DA of kidney extracts from control, Kansui Radix, Kansui Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma 1:4 treated-rats at day 14 ($R^2 = 84.3\%$, $Q^2 = 79.1\%$)



A. 空白组 VS 甘草组 ($R^2 = 83.9\%$, $Q^2 = 75.1\%$); B. 空白组 VS 甘遂组 ($R^2 = 93.4\%$, $Q^2 = 82.4\%$); C. 空白组 VS 甘遂-甘草 (1:4) 组 ($R^2 = 71.2\%$, $Q^2 = 64.5\%$)

图 4 给予药物第 14 天大鼠肾脏不同组别的 correlation coefficient-loading 相关

Fig. 4 Correlation coefficient-loading plot of kidney extracts from control, Kansui Radix, Kansui Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma 1:4 treated-rats at day 14

加,与笔者的前期研究结论具有一致性,进一步证实甘遂能够导致机体氨基酸代谢途径的紊乱。甘遂组大鼠的血浆生化分析结果显示肌酐和尿素氮的含量增加,并且 NMR 结果中给予甘遂组大鼠的血浆和肾脏提取物中的肌酸/肌酐含量也出现明显的升高,说明肾小球的过滤功能到一定的影响,提示甘遂导致肾功能的损伤^[10]。同时,甘遂组大鼠的肾脏组织出现了肾小管上皮细胞明显水肿,空泡变性的病理学改变也从另一方面证实了甘遂的肾脏损伤作用。然而甘遂甘草 1:4 组大鼠的肾脏提取物中并未出现这些内源性代谢物的含量变化,同时其引起肾脏病理学改变较轻微,说明甘遂甘草配伍可能是通过拮抗甘遂引起的氨基酸代谢紊乱以及下调甘遂引起的机体内肌酸/肌酐这一途径来体现其对肾脏的减毒作用。

胆碱和磷酸胆碱是脂质代谢的产物^[11],实验发现甘遂组和甘遂-甘草 1:4 组大鼠的肾脏提取物中胆碱和磷酸胆碱的含量均出现显著下降,说明二者均可能抑制脂质的分解代谢,影响了大鼠的脂肪代谢途径。此外,甘遂组还引起乙酸含量的显著升高和谷氨酰胺的含量下降。其中乙酸是短链脂肪酸氧化的 1 个产物(乙酰乙酸 + 乙酰辅酶 → 乙酰辅酶 A + 乙酸),其含量上升表明机体的脂肪代谢可能发生紊乱。而谷氨酰胺作为肾脏产氨的重要前体,对酸碱平

衡的调节起着十分重要的作用,实验发现谷氨酰胺的含量下降,伴随着乙酸含量增加,说明甘遂组大鼠机体内的酸碱平衡可能受到了破坏。对比甘遂-甘草 (1:4) 组,并未引起上述代谢物的显著变化,说明通过甘草的配伍作用能够一定程度缓解甘遂引起的脂肪代谢紊乱及酸碱平衡失衡,发挥减毒的功效。

综上,无论是代谢组学对内源性代谢物变化的分析还是传统毒理学方法的验证,甘遂-甘草 (1:4) 配伍都能够对甘遂毒性作用起到一定程度的缓解作用。本研究在明确甘遂毒性的基础上,系统的分析了甘遂-甘草 (1:4) 配伍的减毒作用,初步阐述甘遂-甘草配伍减毒机制,为传统中药配伍减毒作用评价提供新的方法和思路。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:83.
 [2] 任子和,杨瑶珺,阎玉凝,等. 我国药典 2010 年版一部毒性中药概况 [J]. 首都医药,2010(14):15-16.
 [3] Wu T S, Li Y M, Hirana M, et al. Antitumor agent, kansuiphofins A and B, two novel antileukemic diterpene egber from *Euphorbia kansui* [J]. J Nat Prod, 1991,54(3):823-829.
 [4] 杨志军,邓毅,王昕,等. 甘遂与甘草配伍对小鼠肝脏组织中 MDA,GSH-Px 影响的实验研究 [J]. 中医研究,2006,19(7):15-16.
 [5] 吴仲池. 甘遂与甘草配伍应用概况 [J]. 浙江中医杂志,1995(11):512-514.
 [6] 衡晴晴,卞勇,李磷,等. 海藻、大戟、甘遂和芫花分别与不同剂量的甘草配伍对小鼠肠功能的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志,2013,27(3):374-378.
 [7] 杨永霞,唐冰雯,丁佳佳,等. 甘遂毒性的血浆代谢组学研究 [J]. 第三军医大学学报,2014,23(1):38-42.
 [8] 唐冰雯,丁佳佳,杨永霞,等. 基于 NMR 的代谢组学对醋制甘遂减毒作用的研究 [J]. 中药药理与临床,2013,29(4):98-103.
 [9] Zhang H, Ding L, Fang X, et al. Biological responses to perfluorododecanoic acid exposure in rat kidneys as determined by integrated proteomic and metabolomic studies [J]. PLoS ONE,2011,6(6):1-11.
 [10] Gartland K P, Bonner F W, Nicholson J K. Investigations into the biochemical effects of region-specific nephrotoxins [J]. Mol Pharmacol, 1989, 35(2):242-250.
 [11] Tjoa S, Fennessey P. The identification of trimethylamine excess in man: quantitative analysis and biochemical origins [J]. Anal Biochem,1991,197(1):77-82.

[责任编辑 邹晓翠]