

## 栀子苷对大鼠的肾脏毒性作用

冯筱懿<sup>1,2</sup>, 田婧卓<sup>2</sup>, 易艳<sup>2</sup>, 李春英<sup>2</sup>, 张宇实<sup>2</sup>, 王连媚<sup>2</sup>, 潘辰<sup>2</sup>,  
赵雍<sup>2</sup>, 李小龙<sup>2</sup>, 李桂琴<sup>2</sup>, 梁爱华<sup>2\*</sup>

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:探讨栀子苷对大鼠的肾脏毒性。方法:将大鼠随机分为空白组,栀子苷(50,100,300 mg·kg<sup>-1</sup>)组,每组8只。栀子苷组每日给药1次,连续给药3 d后收集大鼠尿液,分析肾脏损伤因子(KIM-1),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)水平;取血液检测尿素氮(BUN)和肌酐(CRE);取肾脏组织进行肾脏病理学分析。结果:栀子苷300 mg·kg<sup>-1</sup>组肾小管细胞轻度肿胀,呈现空泡样变性,显示栀子苷在该剂量下可造成肾脏毒性;50,100 mg·kg<sup>-1</sup>组肾脏未见明显病理变化。栀子苷不同剂量组血液生化指标BUN,CRE无明显变化。栀子苷(300 mg·kg<sup>-1</sup>)组5/6大鼠的尿液KIM-1水平显著增高,3/6大鼠的尿液NGAL水平显著增高。结论:栀子苷在较高剂量(300 mg·kg<sup>-1</sup>)水平经口给药3 d可造成大鼠肾脏病理损伤,在该剂量下,常规用于检测肾损伤的指标血液BUN,CRE尚未产生明显变化,在常规的肾脏功能指标基础上增加尿液KIM-1检测可能更好地预测肾脏毒性。

**[关键词]** 栀子苷; 肾毒性; 肾脏损伤因子; 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)10-0118-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016100118

## Nephrotoxicity Effect of Gardenoside in Rats

FENG Xiao-yi<sup>1,2</sup>, TIAN Jing-zhuo<sup>2</sup>, YI Yan<sup>2</sup>, LI Chun-ying<sup>2</sup>, ZHANG Yu-shi<sup>2</sup>,  
WANG Lian-mei<sup>2</sup>, PAN Chen<sup>2</sup>, ZHAO Yong<sup>2</sup>, LI Xiao-long<sup>2</sup>, LI Gui-qin<sup>2</sup>, LIANG Ai-hua<sup>2\*</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;  
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the nephrotoxicity effect and mechanism of gardenoside in rats. **Method:** Rats were randomly divided into blank group, gardenoside 50 mg·kg<sup>-1</sup>, gardenoside 100 mg·kg<sup>-1</sup>, and gardenoside 300 mg·kg<sup>-1</sup> groups, *n* = 8 in each group. The rats in gardenoside groups were given with gardenoside for 3 days, once a day. Then their urine samples were collected to analyze kidney injury molecule-1 (KIM-1) and neutrophil gelatin-associated lipocalin (NGAL) levels in urine, their blood samples were taken to detect blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (CRE) levels, their renal tissues were taken for renal pathology analysis. **Result:** Rats in gardenoside 300 mg·kg<sup>-1</sup> group showed renal toxicity. The renal tubules were slightly swelling with vacuolar degeneration. Gardenoside 50 and 100 mg·kg<sup>-1</sup> groups showed no obvious pathological changes. There was no significant change in blood BUN and CRE levels in all gardenoside dose groups, but urine KIM-1 level was significantly increased in 5/6 rats and urine NGAL level was significantly increased in 3/6 rats of gardenoside 300 mg·kg<sup>-1</sup> group. **Conclusion:** Higher dose gardenoside (300 mg·kg<sup>-1</sup>) could cause renal pathological injury in rats after 3 days of oral administration. Under this dose, the addition of urine KIM-1 testing based on routine renal function indexes would probably provide better prediction of nephrotoxicity.

**[Key words]** gardenoside; nephrotoxicity; kidney injury molecule-1; neutrophil gelatin-associated lipocalin

**[收稿日期]** 20160203(004)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2015ZX09501004-003,2014ZX09304307001)

**[第一作者]** 冯筱懿,在读硕士,从事中药毒理研究,Tel:010-84252805,E-mail:seth0629@163.com

**[通讯作者]** \*梁爱华,研究员,从事中药药理与毒理研究,Tel:010-64288601,E-mail:liangaihua@sina.com

栀子最早记载于《神农本草经》,在中国使用其治疗疾病的历史超过了 2 000 年。栀子味苦、性寒,有泻火除烦、清热利湿、凉血解毒的功效,可用于热病心烦,湿热黄疸,淋证涩痛,血热吐衄,目赤肿痛,火毒疮疡,外治扭挫伤痛。很多经典方中都有栀子的配伍使用,如《伤寒论》中的茵陈蒿汤和栀子豉汤,《金匱要略》中的栀子大黄汤,《外台秘要》中的黄连解毒汤等。另一方面,在我国栀子还是一种保健食品的原料。从栀子中提取的色素栀子黄(gardenia yellow)和蓝色素(gardenia blue)是被广泛食用的食品色素。栀子苷被认为是栀子中的主要有效成分,2015 年版《中国药典》中将栀子苷作为栀子的含量检测指标。栀子苷具有抗炎、解热、利胆和轻泻作用,是栀子中的抗炎和治疗软组织损伤的主要成分<sup>[1]</sup>。但近年已经有多篇文献报道栀子以及栀子苷对肝脏有一定的毒性作用。相关研究显示栀子水提物 3.08 g·kg<sup>-1</sup>,栀子醇提物 1.62 g·kg<sup>-1</sup>,栀子苷 0.28 g·kg<sup>-1</sup> 给药 3 d 可导致大鼠肝重增加,肝指数增大,光学显微镜下可见明显的肝细胞肿胀、坏死等病变<sup>[2-3]</sup>。贾睿<sup>[4]</sup> 研究显示栀子苷水溶液 0.42, 0.84, 1.26 g·kg<sup>-1</sup> 给药 14 d 可导致小鼠肝脏明显变暗发黑,体积增大,光学显微镜下可见弥漫性水样变性,严重程度随剂量增加;刘江亭等<sup>[5]</sup> 研究显示栀子水提物 3 g·kg<sup>-1</sup> 给药 7 d 可导致大鼠胃部浆膜面充血水肿,有黄色炎性分泌物;李红专等<sup>[6]</sup> 研究显示栀子水煎液 9 g·kg<sup>-1</sup> 给药 40 d 后大鼠甲状腺质地略硬,颜色偏白,镜下可见其滤泡萎缩,体积变小,滤泡上皮细胞增生肥大。但栀子苷对肾脏是否能造成毒性影响却未见相关报道。本研究探讨栀子苷在一定剂量下对肾脏可造成的毒性。

## 1 材料和方法

**1.1 动物** SPF 级健康雄性 SD 大鼠 32 只,6~8 周龄,体重(80±15)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001。饲养于中国中医科学院医学实验动物中心动物房,采用人工光照,12 h 明暗周期,环境温度维持在 20~26℃,湿度在 40%~70%,自由饮食。动物实验经过中国中医科学院中药研究所动物伦理委员会批准。

**1.2 试剂和仪器** 栀子苷(北京赛百草科技有限公司,批号 S140807),含量为 97.122%,给药时用纯净水配制。肌酐(CRE),尿素氮(BUN)生化试剂盒(北京万泰德瑞诊断技术有限公司,批号分别为 SG5102A,SG5101A),大鼠肾脏损伤因子(KIM-1),

中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(美国 R&D 公司,批号分别为 1347008,326174)。

BSA3202S-CW 型电子天平(德国 Sartorius 公司),3-18K 型高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司),TBA-40FR 型全自动生化分析仪(日本 Toshiba 公司),varioskan flash 型酶标仪(美国 Thermo 公司),IX71 型光学倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

**1.3 分组及给药** 大鼠适应性饲养 1 d 后按体重随机分成正常组、栀子苷(50,100,300 mg·kg<sup>-1</sup>)组,每组各 8 只。栀子苷组 ig 给予不同剂量的栀子苷溶液,每天 1 次,连续给药 3 d。正常组 ig 给予等体积纯净水。

**1.4 指标检测** 末次给药后,将大鼠放入代谢笼中禁食不禁水,收集 16 h 尿液,4℃,3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清,按照 ELISA 试剂盒说明书进行 KIM-1,NGAL 检测。尿液收集完毕后,麻醉大鼠,经腹主动脉取血,4℃,3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,分离血清,采用东芝 40FR 全自动生化测试仪测定检测 CRE,BUN 含量。取血后处死大鼠,摘取肾脏,称肾脏重,计算肾/体重;将肾脏固定、脱水、石蜡包埋、切片、苏木素伊红(HE)染色,观察病理变化。

**1.5 统计学分析** 采用 SPSS 18.0 软件进行分析处理。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 栀子苷对大鼠肾脏质量和肾脏指数的影响** 给予栀子苷 3 d 后,栀子苷 300 mg·kg<sup>-1</sup> 组的肾脏指数较空白组显著升高( $P < 0.01$ )。与空白组比较,栀子苷各剂量组的尿量未见明显的升高或降低。见表 1。

表 1 栀子苷对大鼠肾脏指数的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 1 Effect of gardenoside on renal indexes in rats( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	肾重 /g	肾脏指数 /g·(100 g) <sup>-1</sup>	尿量 /mL
空白	-	1.90 ± 0.18	9.50 ± 0.77	5.67 ± 0.49
栀子苷	50	1.88 ± 0.11	9.39 ± 0.51	5.83 ± 0.55
	100	1.91 ± 0.06	9.83 ± 0.35	5.57 ± 0.43
	300	2.00 ± 0.17	11.04 ± 0.48 <sup>1)</sup>	5.28 ± 0.75

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$  (表 3 同)。

**2.2 栀子苷对大鼠血液 BUN,CRE 含量的影响** 3 d 后,与空白组比较,栀子苷 50,100,300 mg·kg<sup>-1</sup> 组血清 BUN,CRE 水平均未见明显变化。见表 2。

**2.3 栀子苷对大鼠肾脏组织病理变化的影响** 正常组肉眼可见肾脏色泽红润,质地柔软,镜下观察肾

表 2 栀子苷对大鼠血液 BUN, CRE 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 2 Effect of gardenoside on blood BUN and CRE levels in rats

( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	BUN /mmol·L <sup>-1</sup>	CRE /μmol·L <sup>-1</sup>
空白	-	4.33 ± 0.76	18.00 ± 2.39
栀子苷	50	4.53 ± 0.65	17.25 ± 2.43
	100	3.74 ± 0.53	16.50 ± 2.20
	300	4.65 ± 0.91	20.57 ± 4.50

小管及肾小球组织结构正常。与正常组比较,栀子苷 300 mg·kg<sup>-1</sup>组肉眼可见肾脏颜色加深,整体呈现墨绿颜色,可能与肾脏组织有栀子苷药物有关。随剂量降低,肾脏的墨绿颜色变浅。栀子苷 300 mg·kg<sup>-1</sup>组可见肾小管细胞轻度肿胀,有的大鼠肾小管上皮细胞呈现空泡样变性,肾小球基本正常。栀子苷(100, 50 mg·kg<sup>-1</sup>)组的肾小球和肾小管结构未见明显异常。见图 1。

表 3 栀子苷对大鼠尿液 KIM-1, NGAL 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 3 Effect of gardenoside on urine KIM-1 and NGAL levels in rats

( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	KIM-1	NGAL
空白	-	0.383 ± 0.092	11.625 ± 1.466
	50	0.519 ± 0.253	18.385 ± 3.793 <sup>1)</sup>
	100	0.530 ± 0.157	11.184 ± 2.747
	300	3.805 ± 2.100 <sup>1)</sup>	52.743 ± 35.004

以上。结合病理学检查可见,给予栀子苷后,肾脏病理有改变的大鼠其尿液 KIM-1 水平基本上均增高,其中部分大鼠 NGAL 水平也增高。见表 4。

表 4 栀子苷高剂量组 KIM-1, NGAL 水平比较

Table 4 Comparison of urine KIM-1 and NGAL levels in rats of high dose gardenoside group

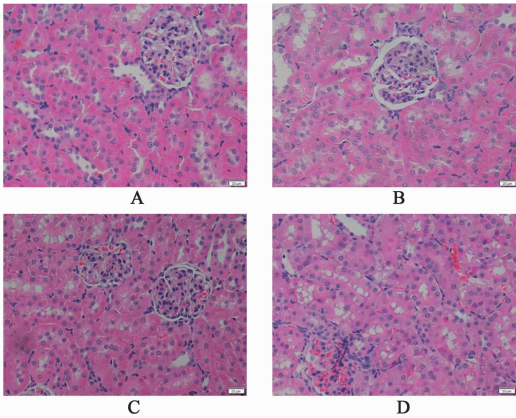
大鼠 编号	KIM-1		栀子苷 /空白	NGAL		栀子苷 /空白	栀子苷 病理 损伤
	空白/ μg·L <sup>-1</sup>	栀子苷/ μg·L <sup>-1</sup>		空白/ μg·L <sup>-1</sup>	栀子苷/ μg·L <sup>-1</sup>		
1	0.344	1.332	3.7	10.439	10.392	0.8	+
2	0.329	6.679	18.4	9.707	8.766	0.7	+
3	0.530	0.681	1.9	19.773	19.401	1.5	+
4	0.411	2.678	7.4	12.581	84.039	6.5	++
5	0.260	3.235	8.9	12.320	78.857	6.1	++
6	0.301	5.103	14.1	13.080	71.029	5.5	++

注:空白组肾脏均未见明显病理损伤;+。肾小管细胞轻度肿胀、变性,管腔内少量渗液;++。肾小管细胞肿胀较明显,空泡化,少量细胞脱落至管腔。

### 3 讨论

中药栀子临床上广泛应用,其性苦寒,一般用于热证,包括热病心烦,湿热黄疸,淋证涩痛,血热吐血等。栀子还被列入药食两用名录。历代本草未言栀子有毒,说明其毒性较低。2010 年版《中国药典》规定其用量为 6~10 g,一般来说在正常剂量范围内辨证使用栀子比较安全。然而近年来有研究显示,栀子及其主要成分栀子苷有一定的肝脏毒性,栀子对肾脏也可造成一定的损伤<sup>[2-3]</sup>,然而,栀子苷对肾脏的应用以及造成肾脏毒性的剂量尚不清楚。

KIM-1 和 NGAL 是近年来发现的肾脏损伤早期标志物。KIM-1 是存在于肾脏近端小管上皮细胞的 I 型跨膜糖蛋白,其细胞外域在基质金属蛋白(MMPs)的作用下可裂解为可溶性片段释放入细胞外,并排入尿中。KIM-1 在急性肾损伤的肾小管上皮细胞中高表达,并呈时间依赖性,对于检测肾脏毒性敏感性较高<sup>[7]</sup>;Prozialeck 等<sup>[8]</sup>比较了镉肾毒性的指标,发现与 α-谷胱甘肽 S 转移酶(α-GST),N 乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)等指标比较,KIM-1 在尿液中出现的最早;此外,Huo 等<sup>[9]</sup>研究发现肾小管上皮细胞中 KIM-1 表达的多少与组织中的骨桥蛋白水平



A. 空白组;B~D. 栀子苷(50,100,300 mg·kg<sup>-1</sup>)组

图 1 栀子苷对大鼠肾组织形态的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of gardenoside on kidney morphology in rats(HE, ×400)

#### 2.4 栀子苷对大鼠尿液 KIM-1, NGAL 水平的影响

与正常组比较,栀子苷 300 mg·kg<sup>-1</sup>组尿液 KIM-1 水平显著升高( $P < 0.01$ );栀子苷 100, 50 mg·kg<sup>-1</sup>组的尿液 KIM-1 水平无明显变化。栀子苷 50 mg·kg<sup>-1</sup>组尿液 NGAL 水平显著升高( $P < 0.01$ ), 300 mg·kg<sup>-1</sup>组的 NGAL 水平无明显变化。见表 3。

#### 2.5 栀子苷 300 mg·kg<sup>-1</sup>组对大鼠尿液 KIM-1, NGAL 水平的影响

栀子苷 300 mg·kg<sup>-1</sup>组的 6 只大鼠中有 5 只大鼠的尿液 KIM-1 水平较空白组平均值明显增高(相当于空白组 3 倍以上),其中有 4 只大鼠的 KIM-1 水平达到空白组平均值的 7 倍以上。300 mg·kg<sup>-1</sup>组 6 只大鼠中有 3 只大鼠的尿液 NGAL 水平较空白组平均值明显增高(占 50%),均达到空白组平均值的 5 倍以上。NGAL 水平增高的 3 只大鼠,其 KIM-1 水平也显著增高,均达到空白组平均值的 7 倍

密切相关,反应了肾小管间质纤维化的程度。NGAL 是一种损伤诱导的转铁蛋白,分子量很小,能够经肾小球自由滤过而出现在尿液中。尿液中 NGAL 的含量可以反映近端小管损伤和肾小球的功能<sup>[10]</sup>。赵宁等<sup>[11]</sup>研究证实在肾脏急性损伤的情况下 NGAL 的表达要早于血清肌酐数值上升的时间;Heise 等<sup>[12]</sup>的研究显示尿液中 NGAL 的上升是心脏手术后急性肾损伤的早期迹象。相关研究在顺铂肾毒性模型早期即观察到 NGAL 和 KIM-1 在肾组织和尿中的表达,成为反映肾小管毒性损伤的敏感指标<sup>[13-14]</sup>。

本研究显示,栀子苷在  $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量下给大鼠 *ig* 给药可造成肾脏损伤,可见肾脏指数增大、肾小管上皮细胞肿胀、变性、空泡化。然而传统用于检测肾脏损伤的指标血液 BUN 和 CRE 没有明显的变化,说明栀子苷  $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量下的毒性表现不足以引起传统肾功能指标 BUN 和 CRE 显著表达。而新的指标尿液 KIM-1 和 NGAL 在栀子苷给药后显示增高,在高剂量组增高幅度较明显。从高剂量组大鼠个体数据来看,NGAL 明显增高的大鼠其 KIM-1 水平也明显增高,肾脏病理检查也显示有病理损伤,说明二者有一定相关性。但是,有少数 KIM-1 增高且肾脏也呈现有病理损伤的大鼠其 NGAL 未见明显增高。并且 KIM-1 水平增高呈现一定的剂量关系,而 NGAL 个体差异较大,剂量关系不及 KIM-1 明显。可见,KIM-1 对于检测肾脏损伤比 NGAL 更为敏感。因此,在栀子临床应用中除了目前常用的检测肾功能的指标 BUN 和 CRE 以外,尚需增加新的更为敏感的指标用于监测肾脏毒性,如 KIM-1,NGAL 检测。

本研究显示,造成肾脏毒性的栀子苷剂量为  $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,栀子苷  $50, 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量下未见明显损伤。有研究显示,不同产地栀子中的栀子苷含量范围为  $23.5 \sim 44.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ <sup>[15]</sup>,平均约  $35 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。大鼠产生毒性的栀子苷剂量  $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  约相当于栀子  $8.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。大鼠与人体表面积折算系数为 6.3,故大鼠毒性剂量  $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  推算到人约为  $47.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (约相当于栀子  $1.36 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。2015 年版《中国药典》推荐栀子的日用量为  $6 \sim 10 \text{ g}$  (按照人体重  $60 \text{ kg}$  计,为  $0.1 \sim 0.17 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。毒性剂量相当于临床剂量的  $8 \sim 13$  倍。

本研究结果提示,尽管栀子历来被认为无毒,也作为药食两用原料,但其剂量过大也可能造成肾脏毒性,提示临床使用应控制剂量,不宜过量。

#### [参考文献]

- [1] 任治军,张立明,何开泽,等. 栀子主要成分的提取工艺及药理研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2005,17(6):831-836.
- [2] 杨洪军,付梅红,吴子伦,等. 栀子对大鼠肝毒性的实验研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(13):1091-1093.
- [3] 王波,杨洪军,高双荣,等. 栀子对大鼠肝毒性的病理学观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(5):45-48.
- [4] 贾睿. 应用栀子苷灌胃建立小鼠肝损伤模型的初步研究[D]. 郑州:河南中医学院,2011.
- [5] 刘江亭,李慧芬,崔伟亮. 大剂量栀子水煎液对大鼠胃毒性研究[J]. 山东中医杂志,2013,32(4):276-277.
- [6] 李红专,韩旭,韩冰冰,等. 寒性中药栀子对大鼠甲状腺功能及结构的影响[J]. 辽宁中医药大学学报,2014,16(4):7-9.
- [7] Han W, Waikar S, Johnson A, et al. Urinary biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury[J]. *Kidney Int*,2008,73(7):863-869.
- [8] Prozialeck W C, Edwards J R, Vaidya V S, et al. Preclinical evaluation of novel urinary biomarkers of cadmium nephrotoxicity [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009,238(3):301-305.
- [9] Huo W, Zhang K, Nie Z, et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel kidney-specific injury molecule playing potential double-edged functions in kidney injury [J]. *Transplant Rev(Orlando)*,2010,24(3):143-146.
- [10] Tonomura Y, Tsuchiya N, Torii M, et al. Evaluation of the usefulness of urinary biomarkers for nephrotoxicity in rats[J]. *Toxicol*,2010,273(1/3):353-359.
- [11] 赵宁,费晓,王鸣,等. 急性肾损伤患者尿液 IL-18、NGAL 的变化[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2013,14(4):334-335.
- [12] Heise D, Rentsch K, et al. Comparison of urinary neutrophil glucosaminidase-associated lipocalin, cystatin C, and  $\alpha 1$ -microglobulin for early detection of acute renal injury after cardiac surgery[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2011,39(1):38-43.
- [13] Mishra J, Mori K, Ma Q, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity [J]. *Am J Nephrol*, 2004, 24(3):307-315.
- [14] Ichimura T, Hung C C, Yang S A, et al. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*,2004,286(3):F552-563.
- [15] 周莉,阎静,王琦,等. 不同产地栀子生品中栀子苷含量的测定[J]. 中国中药杂志,2002,27(10):785-786.

[责任编辑 张丰丰]