

土茯苓对急性汞中毒大鼠的保护作用研究

郑捷, 郑宇翔, 肖凤霞*, 林励, 林靖然

(广州中医药大学中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:探讨土茯苓对急性汞中毒大鼠的保护作用。方法:将大鼠随机分为正常对照组、模型组、土茯苓高、中、低剂量组(5, 10, 20 g·kg⁻¹), 模型组及土茯苓高、中、低剂量组 sc 2.5 mg·kg⁻¹ HgCl₂ 溶液, 连续 2 d, 造成汞中毒, 正常对照组 sc 生理盐水;土茯苓水煎液低、中、高剂量组末次染毒后开始 ig 给药, ig 体积 10 mL·kg⁻¹, 2 次/d, 早晚各 1 次, 持续 3 d, 观察土茯苓对染汞大鼠血清尿素氮(BUN)、汞、尿蛋白、尿乳酸脱氢酶(LDH)、尿碱性磷酸酶(ALP)活力、尿汞、肾汞、肝汞含量及肾脏病理组织学变化的影响。结果:与正常对照组比较, 模型组尿汞、血汞和肝汞、肾皮质汞含量, 尿 LDH 及 ALP 活力, 尿蛋白和血清 BUN 含量均显著提高($P < 0.01$), 肾脏损伤明显;与模型组对比, 土茯苓水煎液高、中剂量组血清 BUN、尿蛋白, 尿 LDH 及 ALP 活力, 肾、肝及血汞含量显著降低, 尿汞含量显著增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);肾脏病理组织学观察结果显示, 高剂量组土茯苓对汞中毒大鼠肾损伤有较好的修复作用。结论:土茯苓具有能够改善汞中毒大鼠肝肾功能、去除体内汞蓄积的作用, 对汞中毒大鼠具有一定的防治作用。

[关键词] 土茯苓; 急性汞中毒; 保护作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0163-04

[doi] 10.11653/syjf2014040163

Role of *Smilax glabra* in Preventing Acute Mercury Toxicity in Rats

ZHENG Jie, ZHENG Yu-xiang, XIAO Feng-xia*, LIN Li, LIN Jing-ran

(School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of *Smilax glabra* in the protective effect of acute mercury

[收稿日期] 20130823(001)

[第一作者] 郑捷, 硕士研究生, 从事中药资源开发利用与新药研究, Tel:18998412141, E-mail:352163190@qq.com

[通讯作者] * 肖凤霞, 博士, 教授, 从事中药资源开发利用与新药研究, Tel:020-39358250, E-mail:xfx92@163.com

[2] 冯其麟. 理气消瘿片的药学研究[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2008.

[3] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2001:1512.

[4] 丁选胜, 阚毓铭, 李欧. 海藻甘草对甲状腺肿模型大鼠甲状腺激素及其抗体的影响[J]. 中草药, 2003, 34(1):54.

[5] 马晓霞, 刘晓冬, 邵德荣. 右归丸加味联合优甲乐治疗亚临床甲状腺功能减退[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5):240.

[6] 高天舒, 韩晓晴, 尹慧丝. 补中益气汤对甲状腺功能减退大鼠心肌细胞凋亡及 Fas, FasL 和 Caspase-3 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10):236.

[7] Tsujimoto Y, Ikegaki N, Croce C M, et al.

Characterization of the protein product of Bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma [J]. Oncogene, 1987, 2(1):3.

[8] Taylor A H, Millatt L J, Whitley G S, et al. The effect of basic fibroblast growth factor on the growth and function of human thyrocytes[J]. J Endocrinol, 1993, 136(2):339.

[9] Yoon S N, Kim K S, Cho J H, et al. Phospholipase D1 mediates bFGF-induced Bcl-2 expression leading to neurite outgrowth in H19-7 cells[J]. Biochem J, 2012, 441(1):407.

[10] D'Inzeo S, Nicolussi A, Nardi F, et al. Effects of the Smad4 C324Y mutation on thyroid cell proliferation[J]. Int J Oncol, 2013, 42(6):1890.

[责任编辑] 聂淑琴

poisoning in rats. **Method:** The rats were divided into five groups: normal control group, model group, high, middle and low dose of *S. glabra* group. The control group was only given 0.9% saline by subcutaneous injection and the other groups were injected with HgCl_2 of $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ once a day for two days, the high, middle and low dose of *S. glabra* group were orally given twice a day for three days after the last injection, the influence of *S. glabra* aqueous extract on the serum blood urea nitrogen (BUN), lactate dehydrogenase (LDH) and alkaline phosphatase (ALP), the urinary protein, the levels of mercury in urine, renal cortex and liver and the renal histopathological changes were observed. **Result:** Compared with the blank control group, the serum BUN, the urinary activities of LDH and ALP, the urinary protein, and the levels of mercury in urine, renal cortex and liver from the chlorinated mercury group were increased significant ($P < 0.01$). Further more, compared with the model group, the serum BUN, the urinary activities of LDH and ALP, the urinary protein, and the levels of mercury in urine, renal cortex and liver from the high or medium *S. glabra* aqueous extract group were reduced significant ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The results of kidney pathological histology observation showed that *S. glabra* had an obviously improvement on the acute mercury poisoning rats. **Conclusion:** *S. glabra* can improve the liver and kidney function of mercury poisoning in rats and decrease the accumulation of mercury *in vivo*, the *S. glabra* shows definite preventive and therapeutic effect on acute mercury poisoned rats.

[**Key words**] *Smilax glabra*; acute mercury toxicity; protective effect

汞及其化合物被广泛应用于农药、染料、电池、杀菌剂、防腐剂等的生产,通过多种途径对机体产生毒性作用。各种形态的汞及其化合物都会对机体造成以神经性和肝、肾脏毒性为主的多系统损害,其中以金属汞和甲基汞对人体的危害最显著。汞作为一种重金属污染,已成为一个全球性污染问题,被列为化学物质安全性程序中 6 种最危险的物质之一。随着汞及其化合物的污染问题日益严重,如何预防及治疗汞对机体的毒性作用显得尤为重要,研制开发安全、方便、高效的汞中毒防治药物具有重要的意义。

土茯苓是百合科植物光叶菝葜的干燥根茎。土茯苓首载于《本草纲目》,谓其“健脾胃,强筋骨,去风湿,利关节,止泄泻,治拘挛骨痛,恶疮痈肿,解汞粉,银朱毒^[1]。”《中国药典》2010 年版记录土茯苓具有解毒,除湿,通利关节作用,用于梅毒及汞中毒所致的肢体拘挛,筋骨疼痛;湿热淋浊,带下,痈肿,瘰疬,疥癣^[2]。土茯苓作为用于治疗汞中毒的良药,使用历史久远,古今药物文献均有记载^[3-5]。本研究采用皮下注射氯化汞溶液建立大鼠汞中毒模型,探讨土茯苓对 HgCl_2 所致大鼠急性损伤的保护作用,以期为研究汞中毒的作用机制和防治措施提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 Wistar 大鼠[广州中医药大学实验动物中心,许可证号 SCXK(粤)2012-0005]40 只,体重 220 ~ 250 g,雌雄各半。动物自由饮水摄食,动

物室温度 18 ~ 23 °C,相对湿度 45% ~ 55%。正式实验前适应性饲养 7 d。

1.2 药品及试剂 土茯苓(广州至信中药饮片有限公司,生产批号 120701,经广州中医药大学林励研究员鉴定为百合科菝葜属植物光叶菝葜 *Smilax glabra* Roxb. 的干燥根茎);土茯苓药材干燥至恒重后粉碎,过四号筛,称取 400 g 粉末,10 倍量水煎煮 2 次,每次 60 min,2 次药液过滤后合并,适当浓缩后离心取上清液,80 摄氏度下浓缩至 400 mL(折合生药量 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),用于低剂量给药;分取 100 mL 药液继续浓缩至 $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及 $2.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 用于中剂量及高剂量组给药;氯化汞(姜堰市环球试剂厂,批号 20120108);血尿素氮(BUN)、尿蛋白、尿碱性磷酸酶(ALP)活力、尿乳酸脱氢酶(LDH)测试盒均购至南京建成生物工程研究所;其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器 高速离心机(上海医用分析仪器厂),高速分散匀质机(上海标本模型厂),7700 型电感耦合等离子体质谱(美国安捷伦公司),Multiskan FC 型酶标仪(美国赛默飞科技)。

2 方法

2.1 分组及给药 大鼠 40 只,雌雄各半,观察 1 周无异常后,随机分成正常对照组,染汞模型组,土茯苓水煎液高、中、低 3 个剂量组(折合生药量为 5, 10, 20 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组 8 只,雌雄各半,正常对照组皮下注射生理盐水,除正常对照组外其他 4 组大鼠皮下注射 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{HgCl}_2$ 溶液,连续 2 d,造成汞中

毒,土茯苓水煎液低、中、高剂量组末次染毒后开始ig给药,ig体积 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,2次/d,早晚各1次,持续3 d,末次给药后,将大鼠移入代谢笼中,在此期间只供给去离子水,停止食物供应,收集12 h尿样。末次给药24 h后,乙醚麻醉大鼠,仰卧位固定在操作台上剪开腹部皮毛,腹主动脉采血,静置,离心分离血清,用于测定血清BUN含量。处死大鼠切取肝肾,剥离肾被膜,分离肾脏,准确称取肝脏、肾脏各0.5 g,加入4.5 mL 0.9%生理盐水溶液,在冰浴水中用电动匀浆机和超声波细胞粉碎机制成10%组织匀浆;另取相同部位肾脏用于组织病理学检查。

2.2 测定指标及方法 尿LDH及ALP,尿蛋白和血清BUN含量测定均采用试剂盒;血、尿、肾脏和肝脏汞含量的测定采用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)法^[6];肾组织病理检查采用HE染色法,光学显微镜下观察肾脏组织病理改变。

2.3 统计学分析 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用统计软件SPSS 17.0进行方差分析。 $P<0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 肝、肾脏和尿汞含量的变化 由表1可见,染汞模型组大鼠肾汞是肝汞含量的两倍左右,可见肾

脏是汞的主要蓄积部位;与正常对照组比较,染汞模型组大鼠尿、肾和肝汞含量均显著增加,差异有统计学意义($P<0.01$),说明汞中毒模型制备成功。与染汞模型组比较,土茯苓高、中剂量组能够使大鼠尿、肾和肝汞含量显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$),同时土茯苓高、中剂量组均可显著增加大鼠尿中汞的含量,提示土茯苓具有去除体内汞蓄积的作用。

3.2 BUN的变化 由表2可见,染汞模型组大鼠BUN含量显著高于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),说明汞已经造成大鼠急性肾损伤。与染汞模型组比较,土茯苓高、中、低剂量组能够使大鼠BUN显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$),提示土茯苓对肾损伤具有一定的修复作用。

3.3 实验各组尿蛋白,尿LDH,ALP变化 由表2可见,染汞模型组大鼠尿蛋白,LDH,ALP均显著高于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),说明氯化汞已经造成大鼠急性肾损伤;与染汞模型组比较,土茯苓各剂量组能够使大鼠尿蛋白,LDH,ALP不同程度的降低,其中高中剂量组差异有统计学意义($P<0.01$)。

表1 土茯苓对急性汞中毒大鼠肝汞、肾汞、尿汞和血汞含量的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	肝汞/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	肾汞/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	尿汞/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	血汞/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
正常对照	-	0.28 ± 0.08	0.35 ± 0.07	0.32 ± 0.12	0.09 ± 0.03
染汞模型	-	$20.78\pm 5.67^{1)}$	$50.76\pm 11.20^{1)}$	$28.12\pm 3.28^{1)}$	8.05 ± 1.34
土茯苓	5	$15.36\pm 1.58^{2)}$	$36.58\pm 6.73^{2)}$	33.76 ± 4.75	$6.45\pm 0.56^{2)}$
	10	$11.36\pm 3.23^{3)}$	$30.78\pm 3.21^{2)}$	$39.23\pm 2.34^{2)}$	$5.40\pm 0.29^{3)}$
	20	$8.16\pm 2.18^{3)}$	$24.64\pm 3.58^{3)}$	$48.37\pm 7.18^{3)}$	$3.18\pm 0.45^{3)}$

注:与正常对照组比较¹⁾ $P<0.01$;与染汞模型组相比²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ 。

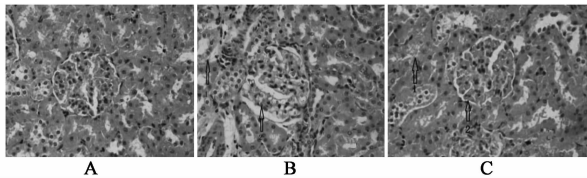
表2 土茯苓对急性汞中毒大鼠尿蛋白、尿LDH、尿ALP及BUN含量的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	尿蛋白/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	尿LDH/ $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$	尿ALP/ $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$	BUN/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
正常对照	-	0.29 ± 0.13	0.56 ± 0.20	26.22 ± 5.39	4.57 ± 0.21
染汞模型	-	$2.65\pm 0.28^{1)}$	$98.49\pm 7.45^{1)}$	$256.12\pm 34.23^{1)}$	$13.08\pm 2.45^{1)}$
土茯苓	5	$2.23\pm 0.13^{2)}$	89.34 ± 8.87	$211.23\pm 23.98^{3)}$	$8.64\pm 3.36^{2)}$
	10	$1.93\pm 0.21^{3)}$	$81.23\pm 6.87^{3)}$	$147.28\pm 19.45^{3)}$	$6.39\pm 2.28^{2)}$
	20	$1.10\pm 0.18^{3)}$	$74.48\pm 5.81^{3)}$	$98.34\pm 14.29^{3)}$	$4.94\pm 1.69^{3)}$

注:与正常对照组比较¹⁾ $P<0.01$;与染汞模型组相比²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ 。

3.4 肾病理组织学观察 如图1(A)所示,正常组大鼠肾组织结构清晰,肾小球及肾小管形态正常,未见变形及坏死。图1(B)显示,汞中毒模型组肾小管数量急剧减少,形态变化极大;肾小球出现较大结构

变化,萎缩程度严重,提示肾组织出现严重病变。图1(C)显示,土茯苓高剂量组干预下的大鼠肾组织出现良性恢复,肾小管形态趋于正常,肾小球萎缩情况明显改善。



A. 正常对照组; B. 染汞模型组; C. 土茯苓 20 g·kg⁻¹给药组

图 1 实验各组肾病理组织学对比(HE 染色法, ×400)

4 讨论

氯化汞(mercuric chloride, HgCl₂)导致的机体损伤被广泛用于学习动物急性损伤的模型中^[7-8]。氯化汞皮下注射进入体内后迅速在各组织分布,组织中汞离子含量与流入该组织的血流量有关,几小时后再向肾脏集中,肾脏是无机汞摄取蓄积和表达毒性最主要的靶器官^[9-10],汞中毒还会引发一定的肝脏损害,因此检测肝肾器官中汞的含量可评价汞中毒程度大小。BUN 高于正常值时表明有效肾单位的 60%~70% 已受到损害,该指标增高程度与肾功能损伤严重性成正比^[11]。汞及其化合物在体内代谢过程中产生自由基,自由基作为一种强氧化剂对肾小球及肾小管上皮细胞产生毒性,造成肾小球滤过膜电荷屏障缺损和对大分子滤过控制的缺损,进而引起胞浆酶尤其是 LDH, ALP, N-乙酰葡萄糖胺酶(NAG)的外漏^[9]。

本实验通过建立大鼠汞中毒动物模型,研究土茯苓对汞中毒大鼠的防治作用,实验结果表明,染汞模型组大鼠肝、肾皮质及尿汞和血清 BUN 含量,尿 LDH, ALP 活力都明显高于正常对照组,说明汞在肝和肾脏蓄积并造成急性肾损伤;土茯苓高、中、低剂量组均能不同程度降低染汞模型组大鼠血清尿素氮以及肾皮质汞和肝脏汞含量,促进汞离子通过尿液排出,并降低 LDH, ALP 活力,提示土茯苓具有改善肾脏功能和去除体内汞蓄积的作用;同时,肾脏病理组织学观察结果显示,土茯苓可明显减轻 HgCl₂ 所致的大鼠急性中毒损伤程度,且具有一定的修复作用。

本项目在研究汞中毒损伤机制的基础上,运用动物模型,研究古方记载及临床应用较多的解汞毒常用中药土茯苓在解汞毒时的作用机制,观察土茯

苓对机体汞中毒损伤器官的保护作用及机体汞排泄的影响。实验结果显示,土茯苓可明显降低汞中毒大鼠汞在体内的残留,促进中毒机体排出汞,同时对机体损伤的肝、肾组织有一定的修复作用,提示土茯苓对于急性汞中毒大鼠具有一定的保护作用,土茯苓可能通过与汞离子形成稳定的配合物、增加尿量来促进体内汞的排泄,抗机体氧化损伤并保护肝肾功能等达到解汞毒作用。

[参考文献]

- [1] 刘衡如,刘山水. 新校注本《本草纲目》. 上册[M]. 北京:华夏出版社,1998:882.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:化学工业出版社,2010:216,18.
- [3] 清. 黄宫秀. 本草求真[M]. 上海:上海科学技术出版社,1959:144.
- [4] 江苏新医学院. 中药大辞典. 上册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1985:91.
- [5] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编. 上册[M]. 北京:人民卫生出版社,1996:43.
- [6] 李伟东,张志杰,陈逸君,等. 电感耦合等离子体光谱法质谱法测定自然铜不同炮制品中铅铜镉汞的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(24):181.
- [7] 郑光耀,陈茂铨. 松针叶绿素-胡萝卜素软膏对汞中毒大鼠防治作用的研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(6):1402.
- [8] 杨海波,徐兆发,刘巍,等. 番茄红素对氯化汞致大鼠肾损伤保护作用[J]. 中国公共卫生,2011,27(10):1279.
- [9] Xu Z, Yang J, Yu J, et al. Effects of BSO, GSH, Vit-C and DMPS on the nephrotoxicity of mercury[J]. Toxicol Ind Health, 2007, 23(7):403.
- [10] 付中祥,杨虹,陈秀芬,等. 朱砂、朱砂安神丸及氯化汞在小鼠体内吸收、分布对比[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(1):162.
- [11] 王家骏,喻道军,刘艳,等. 沙棘油对汞致急性肝肾损伤的保护作用[J]. 环境与职业医学,2011,28(2):109.

[责任编辑 聂淑琴]