

雄黄肾脏毒性的病理形态学特征

高双荣¹, 梁爱华^{1*}, 戴宝强¹, 王丽芳¹, 李桂琴¹, 曹春雨¹, 刘婷¹, 李春英¹, 易艳¹,
王海林¹, 郝然¹, 赵雍¹, 回连强¹, 夏晶², 曹帅², 李丽敏², 季中²

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 上海市食品药品检验所, 上海 201203)

[摘要] 目的: 研究反复灌胃给予雄黄后, 大鼠肾脏毒性的病理形态学特征, 为临床安全、有效地使用雄黄提供科学依据。方法: 随机将大鼠分为对照组和雄黄 0.01, 0.04, 0.17 g·kg⁻¹ 剂量组。各剂量组均每日灌胃给药 1 次, 对照组给予高纯水, 连续 3 个月。于给药后 1, 2, 3 个月和停药 1, 2 个月后, 计算肾脏指数, 测定血清葡萄糖 (GLU)、肌酐 (Cr)、尿素氮 (BUN) 及尿蛋白等, 并观察肾组织病理形态学变化。结果: 连续灌服雄黄 ≥ 0.01 g·kg⁻¹ 3 个月或 0.17 g·kg⁻¹ 2 个月, 肾组织出现不同程度的细胞肿胀, 胞浆空泡变性, 核固缩、溶解及血管扩张、充血等病变, 近曲小管较肾小球损伤严重, 病变呈现明显的量-时-毒关系, 血 BUN、GLU、尿蛋白也相应增高。停药 1 个月后, 除 0.17 g·kg⁻¹ 剂量组有 66.7% 的肾小管轻度水肿、变性外, 其余各组未见明显病变。结论: 大鼠连续灌服雄黄 ≥ 0.01 g·kg⁻¹ 3 个月或 0.17 g·kg⁻¹ 2 个月对大鼠肾脏病理学产生明显影响, 尤其对肾脏近曲小管的损伤作用较为明显, 停药后肾脏病变逐渐恢复至正常。

[关键词] 雄黄; 肾脏; 毒性; 病理

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0297-05

[doi] 10.11653/syfyj2013180297

Morphological Characteristics of Kidney Toxicity in Realgar

GAO Shuang-rong¹, LIANG Ai-hua^{1*}, DAI Bao-qiang¹, WANG Li-fang¹, LI Gui-qin¹, CAO Chun-yu¹,
LIU Ting¹, LI Chun-ying¹, YI Yan¹, WANG Hai-lin¹, HAO Ran¹, ZHAO Yong¹,
HUI Lian-qiang¹, XIA Jing², CAO Shuai², LI Li-min², JI Shen²

[收稿日期] 20130411(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81001692); 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAI55B02-03); 国家科技重大专项(2009ZX09301005); 中国中医科学院自主选题项目(ZZ03046)

[第一作者] 高双荣, 硕士, 助理研究员, 从事病理学工作, Tel: 010-84252805-2231, E-mail: rdou8@sohu.com

[通讯作者] * 梁爱华, 博士, 研究员, 从事药理学工作, Tel: 010-64288601, E-mail: liangaihua@sina.com

进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 李家实. 中药鉴定学[M]. 上海: 上海科技出版社, 1998: 111.
- [2] 盛云华, 李峰杰, 周琦, 等. 山豆根对小鼠的急性肝毒性及其病理形态学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 144.
- [3] 忻耀杰, 滕磊. 山豆根对 SD 大鼠的毒性实验研究[J]. 中医耳鼻咽喉科学研究杂志, 2010, 9(3): 47.
- [4] 李峰杰, 姚广涛, 金若敏, 等. 山豆根致大鼠肝毒性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 190.
- [5] 杨倩, 郑丽娜, 谢元璋, 等. 山豆根不同组分对小鼠急性肝毒性“量-时-毒”关系研究[J]. 中国药物警戒,

2010, 7(7): 385.

- [6] 孙蓉, 李素君, 李晓宇. 不同乙醇提取工艺对山豆根急性毒性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17): 193.
- [7] 姚光弼. 肝脏损伤的机制[J]. 中华消化杂志, 1998, 18(4): 235.
- [8] 赵建国, 周先保, 张金柱. 肝损伤 96 例诊治体会[J]. 中国医药导报, 2008, 8(3): 146.
- [9] 吴惠文, 郝晋慧. 大蒜素对大鼠肝损伤细胞因子保护作用[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(5): 539.
- [10] 吴娜, 蔡光明, 何群. 氧化应激与肝脏损伤[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(29): 3310.

[责任编辑] 聂淑琴

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

[Abstract] Objective: To study the morphological characteristics of kidney toxicity in rats when repeated intra-gastric administration of realgar in order to provide a scientific basis for safe and effective application of realgar. **Method:** The rats were randomly divided into four groups: control group and realgar 0.01, 0.04, 0.17 g·kg⁻¹ groups. The rats were intra-gastrically treated with realgar once a day for successively 90 days, while the control group was given ultra-filtrated water. Calculatate the kidney weight and body weight index were calculated and the glucose, ketones, blood urine nitrogen and urine protein were measured and pathological change of kidney under microscope was observed at 30, 60, 90, 120, 150 days. **Result:** The kidney cells showed swelling, vacuolation, nuclear condensation, breakage, vasodilation and congestion after repeated intra-gastric administration of realgar ≥ 0.01 g·kg⁻¹ successively 90 days or 0.17 g·kg⁻¹ successively 60 days. Proximal convoluted tubules were seriously damaged. The lesions showed significant dose and time and toxicity relationship, blood urine nitrogen, glucose, urine protein also increased accordingly. 66.7% of the renal tubular in 0.17 g·kg⁻¹ group showed mild swelling and degeneration at day 30 after drug withdrawal, while the other groups had no significant lesions. **Conclusion:** Kidneys showed severe pathologic injuries after repeated intra-gastric administration of realgar ≥ 0.01 g·kg⁻¹ successively 90 days or 0.17 g·kg⁻¹ successively 60 days. The proximal convoluted tubules may be a main target of arsenic toxicity to kidneys. The lesions can gradually restored to normal after realgar withdrawal.

[Key words] realgar; kidney; toxicity; pathology

雄黄(realgar)是一味常用的含砷矿物药,具有燥湿、杀虫、祛风、解毒等功效^[1-2],既可单独使用也可在复方中配伍使用。2010年版《中国药典》记载的含雄黄的中成药有31种,约占药典成方总数的3.15%^[3]。临床上多用于治疗急性早幼粒细胞白血病、慢性粒细胞白血病、带状疱疹、脓疱疮、溃疡性黑色素瘤、淋巴结核等疾病^[4-5]。雄黄虽然具有独特的疗效,但其也具有一定的毒性。近年来,对于雄黄的毒性研究,取得了一些进展,初步证明了长期应用雄黄,可引起机体多脏器的毒性,如肝脏、肾脏、神经系统、皮肤、胎儿发育等损害^[6-7],已知肾脏是砷毒性代谢的重要的靶器官之一,但有关雄黄中砷在肾脏的蓄积性毒性变化的研究报道不多,对其毒性的病理形态学特征尚不甚了解。因此,本文通过对大鼠连续灌胃给予不同剂量雄黄3个月并停药2个月,观察长期服用雄黄后大鼠肾脏的蓄积性毒性及病理形态学特征,为临床安全、有效地使用雄黄提供科学依据。

1 材料

1.1 药材 雄黄产自湖南石门雄黄矿业,从上海华宇药业有限公司购买,批号 H2008081202。由上海封浜中药饮片厂炮制,以二硫化二砷计,为93.2%;以砷计,为65.3%,可溶性砷为5.05%,含三价砷

2.26%、五价砷0.06%。

1.2 动物 Wistar大鼠,SPF级,雌雄各半,体重150~170g,由北京维通利华实验动物有限公司提供,合格证号SCXK(京)2006-2009。以标准颗粒饲料饲养,由北京市科奥协力饲料有限公司提供。于适应性饲养3d后,给予受试物。在试验期间,动物饲养于SPF动物房内,为全新风,温度20~23℃,相对湿度40%~60%,人工光照,12h明暗周期。动物饲养于不锈钢饲养笼,每笼5只大鼠。每天更换排泄物托盘一次,每周更换清洁和消毒的鼠笼一次。
1.3 试剂 全自动生化分析仪试剂:质控血清RANDOX,批号552UN;尿素氮(BUN),动力法,批号2010010392,肌酐(Cre),苦味酸法,批号0210010127;血糖(GLU),氧化酶法,批号2009010525;以上试剂均由北京万泰德瑞诊断技术有限公司提供。血细胞计数分析所用的稀释液、溶血剂(烟台卓越生物技术有限责任公司提供),尿液分析试纸,批号20090624,长春万成生物电子工程有限公司。

1.4 仪器 全自动组织脱水机(Shandon Excelsior ES,英国),石蜡包埋机(Shandon Histocentre 3,英国),轮转式切片机(Shandon Finesse 325,英国),全自动染色机(Shandon Varistain Gemini,英国),BX51光

学显微镜(Olympus,日本),全自动生化分析仪(Sapphire 600,爱尔兰),Bayer 50 尿液分析仪(德国)。

2 方法

2.1 分组与给药 将大鼠随机分为4组,分别为对照组、雄黄低、中、高剂量组(0.01,0.04,0.17 g·kg⁻¹),其中雄黄的3个剂量分别相当于药典剂量高限(0.1 g·d⁻¹)的1,4,17倍(按照人与大鼠体表面积折算后相当于临床剂量的倍数)。每组雌、雄各21只。每日ig给药1次,给药体积为5 mL·kg⁻¹,连续给药3个月,对照组ig给予同体积含0.3%羧甲基纤维素钠(CMC)的高纯水。

2.2 动物处理时间和样本收集 于给药1,2,3个月和停药1,2个月后,每组取雌雄各5只大鼠,置于代谢笼中,收集0~12 h,12~24 h尿液及0~24 h粪便,定性分析尿糖、尿酮、尿蛋白、尿胆原、白细胞(WBC)等;于末次给药后,禁食17~21 h,将大鼠麻醉后腹主动脉取血,处死动物后进行解剖。

2.3 生化测定 腹主动脉取血,分离血清,测定血液生化指标,包括:测定血清葡萄糖(GLU)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cre)等。

2.4 组织形态学观察 动物解剖时,先肉眼观察主要脏器及组织有无异常病变,然后摘取肝、肾、脑等主要组织,称重后置于4%甲醛溶液中固定。计算肾脏指数(肾脏指数=肾脏质量/体重×100%);并将肾脏制成石蜡切片,在光学显微镜下观察肾脏病理形态学变化,根据本研究中肾脏病变程度制定镜下诊断标准,采用半定量评分标准评价肾小管的损伤程度。

肾脏病变镜下诊断标准“-”:肾组织结构正常,未见明显病变。“+”:肾小管上皮细胞刷状缘

丢失,细胞轻度肿胀,空泡变性,管腔内少量蛋白管型,间质轻度水肿,有少量炎症细胞浸润。“++”:肾小管上皮细胞明显肿胀,胞浆疏松,空泡变性,甚至坏死、脱落,管腔内可见细胞、蛋白管型,间质明显水肿,有少量炎症细胞浸润。

2.5 统计学方法 采用SPSS 16.0统计学软件进行统计分析,大鼠血清生化学指标及肾指数计算采用单因素方差分析进行统计,尿定性指标及肾脏组织病理学分级采用非参数秩和检验进行统计,以 $P < 0.05$ 为差异显著性检验标准。

3 结果

3.1 对尿液定性指标的影响 如表1所示,大鼠给药2个月后,雄黄0.01 g·kg⁻¹组尿蛋白和WBC较对照组有增高趋势($P < 0.1$),给药3个月后,0.04,0.17 g·kg⁻¹组大鼠尿蛋白和WBC较对照组明显增高,有统计学差异。停药后,各组大鼠的尿糖、尿酮、尿蛋白、尿胆原、WBC等均未见明显异常。

3.2 对肾脏功能的影响 大鼠连续给药1,2个月后,实验各组的Cre,BUN,GLU均在正常范围内。给药3个月后,0.01,0.17 g·kg⁻¹组的GLU高于对照组,3个剂量组雌性大鼠的BUN高于对照组,高剂量组雄性大鼠的BUN也高于对照组,有显著性差异。停药1个月后,0.17 g·kg⁻¹组GLU仍高于对照组($P < 0.05$)。停药2个月后,实验各组的GLU,Cre,BUN未见明显异常。详见表2。

3.3 对肾脏指数的影响 如表3所示,大鼠连续给药2,3个月,0.17 g·kg⁻¹组大鼠肾指数较对照组增高。停药1个月后,0.04,0.17 g·kg⁻¹大鼠肾指数高于对照组。停药2个月后,各组大鼠的肾指数与对照组相比未见明显差异。

表1 大鼠连续灌胃给予雄黄2,3个月对各组尿液PRO和WBC的影响

给药时间	组别	含尿蛋白(mg·L ⁻¹)动物数/只				P	含WBC动物数/只			
		-	30	100	≥300		-	Ca 15	Ca 70	P
2个月	正常对照	0	0	4	1		4	1	0	
	雄黄0.01 g·kg ⁻¹	0	0	1	4	$P < 0.1$	1	3	1	$P < 0.1$
	雄黄0.04 g·kg ⁻¹	0	0	0	5	$P > 0.05$	0	4	1	$P < 0.05$
	雄黄0.17 g·kg ⁻¹	0	0	0	5	$P > 0.05$	0	0	5	$P < 0.01$
3个月	正常对照组	0	1	4	0		4	1	0	
	雄黄0.01 g·kg ⁻¹	3	1	1	0	$P > 0.05$	3	2	0	$P > 0.05$
	雄黄0.04 g·kg ⁻¹	0	0	1	4	$P < 0.05$	1	4	0	$P < 0.1$
	雄黄0.17 g·kg ⁻¹	0	0	1	4	$P < 0.05$	0	1	4	$P < 0.01$

表 2 大鼠连续灌胃给予雄黄 3 个月及停药 1 个月对各组血清 GLU 和 BUN 的影响($\bar{x} \pm s$)

mmol·L⁻¹

组别	GLU			BUN	
	3 个月(♂)	停药 1 个月(♂)	停药 1 个月(♀)	3 个月(♂)	3 个月(♀)
正常对照组	7.14 ± 0.83	5.22 ± 0.40	5.61 ± 0.28	7.38 ± 0.89	8.34 ± 0.75
雄黄 0.01 g·kg ⁻¹	7.68 ± 0.24	4.78 ± 0.45	5.11 ± 0.37	6.95 ± 1.31	10.60 ± 2.24 ¹⁾
雄黄 0.04 g·kg ⁻¹	7.21 ± 1.34	5.72 ± 0.20	6.20 ± 0.20	7.06 ± 0.79	9.19 ± 1.42
雄黄 0.17 g·kg ⁻¹	7.48 ± 0.95	6.45 ± 0.89 ¹⁾	6.30 ± 0.54 ¹⁾	9.91 ± 2.21 ¹⁾	9.38 ± 1.33

注:与正常对照组比较¹⁾P < 0.05;²⁾P < 0.01(表 4 同)。

表 3 雄黄口服给药期及停药期对大鼠肾脏指数的影响($\bar{x} \pm s$)

%

给药时间	动物数	性别	正常对照组	雄黄 0.01 g·kg ⁻¹	雄黄 0.04 g·kg ⁻¹	雄黄 0.17 g·kg ⁻¹
2 个月	5	♀	0.666 ± 0.041	0.674 ± 0.055	0.666 ± 0.085	0.706 ± 0.114
3 个月	5	♂	0.579 ± 0.039	0.613 ± 0.082	0.573 ± 0.142	0.597 ± 0.045
停药 1 个月	5	♀	0.678 ± 0.017	0.676 ± 0.036	0.748 ± 0.071	0.731 ± 0.052

3.4 病理形态学变化

3.4.1 雄黄造成肾脏损伤的主要病理表现 连续给药 3 个月后,雄黄对 Wistar 大鼠肾脏的毒性损伤,在病理形态学上主要表现为肾小管上皮细胞刷状缘丢失,细胞不同程度的肿胀,胞浆疏松,空泡变性,甚至坏死、脱落,管腔内可见细胞、蛋白管型,间质不同程度的水肿,并有炎症细胞浸润,肾小球略有肿胀、充血。

3.4.2 雄黄造成肾脏病理变化的剂量和时间关系

正常对照组肾脏组织结构正常,未见明显病变。大鼠连续给予雄黄 1 个月后,低、中、高剂量组肾脏均未见明显病变。连续给药 2 个月后,高剂量组大鼠肾近曲小管上皮细胞轻度肿胀,胞浆疏松,空泡变性,有些上皮细胞脱落,间质灶状炎症细胞浸润,肾小球未见明显病变。雄黄连续给药 3 个月后,低剂量组肾近曲小管上皮细胞轻度肿胀,胞浆疏松,空泡变性,有些上皮细胞脱落,肾小球未见明显病变,较对照组有加重趋势(P < 0.1),而高、中剂量组大鼠各有 20%,10% 的肾脏均出现明显病变,表现为肾小管上皮细胞明显肿胀,胞浆疏松,空泡变性,部分

上皮细胞坏死、脱落,胞核近管腔面,可聚集形成细胞管型,肾小球轻度肿胀、充血,间质内有少量炎症细胞浸润,较对照组有显著性差异(分别为 P < 0.01, P < 0.05)。停药 1 个月时,3 个剂量组肾脏病变有所减轻,高剂量组肾脏病变较对照组仍有显著性差异(P < 0.05),管腔内可见蛋白管型,中、低剂量组肾脏与对照组比较无明显差异。停药 2 个月后,高剂量组有 33.3% 的肾曲管上皮轻度肿胀、变性,高、中和低剂量组的肾脏病变与对照组比较均未见明显差异。见表 4,图 1。

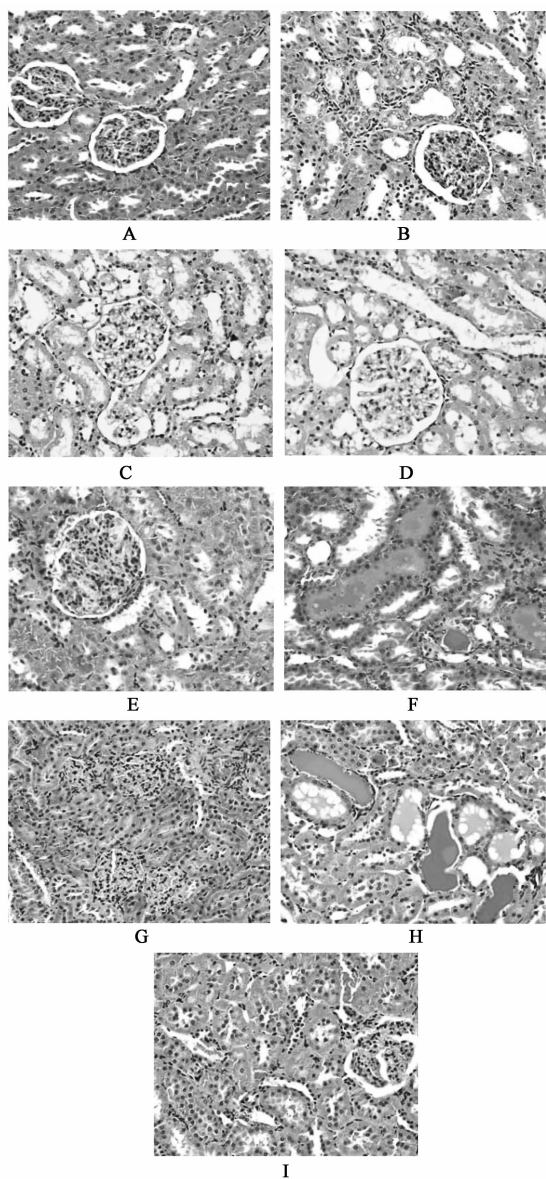
4 讨论

雄黄中的砷进入机体后会发生复杂的变化,转化为多种砷化合物^[8],其中有剧毒的砷化合物在体内长期蓄积可引起肝、肾、皮肤等器官系统的毒性^[9-10]。

本研究通过给大鼠连续灌服不同剂量的雄黄(0.01,0.04,0.17 g·kg⁻¹·d⁻¹)3 个月及停药 2 个月,以研究雄黄在肾脏组织中的蓄积性毒性及其病理形态学特征。结果显示,大鼠连续给予雄黄 2,3 个月后,高、中剂量组大鼠肾指数,尿蛋白及 WBC

表 4 雄黄不同给药时间对大鼠肾脏病理变化的影响

给药时间	n	肾脏病变程度								
		雄黄 0.01 g·kg ⁻¹			雄黄 0.04 g·kg ⁻¹			雄黄 0.17 g·kg ⁻¹		
		-	+	++	-	+	++	-	+	++
空白对照	10	10	0	0	10	0	0	10	0	0
30 d	10	10	0	0	9	1	0	8	2	0
60 d	10	9	1	0	8	2	0	6	4	0
90 d	10	7	3	0	5	4	1	2	6	2
停药 30 d	6	5	1	0	4	2	0	2	3	1
停药 60 d	6	6	0	0	5	1	0	4	2	0



A. 正常对照组;B,C. 雄黄给药2个月 $0.17\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;D. 给药3个月 $0.04\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;E. 给药3个月 $0.17\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;F. 雄黄给药3个月 $0.17\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;G. 雄黄停药1个月 $0.04\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;H. 雄黄停药1个月 $0.17\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;I. 雄黄停药2个月 $0.17\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组

图1 连续灌胃给予雄黄后各组大鼠肾脏病理组织形态学变化(HE, $\times 400$)

均出现不同程度的增高;给药3个月时,3个剂量组的血BUN也高于对照组;且高、低剂量组的GLU的水平也较对照组升高。病理组织形态学观察显示,大鼠连续给予雄黄 $0.01, 0.04\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 2个月,少数肾脏出现轻微病理形态学改变;延长给药时间至3个月,肾近曲小管上皮细胞出现轻度病变,较对照组有加重趋势;连续灌服雄黄 $0.17\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 2个月较1个月时肾近曲小管损伤加重,出现肾小管细胞界限不清、管腔变小成星芒状甚至闭塞等病变;连续给药

3个月后,肾近曲小管不同程度的肿胀、变性,管腔闭塞,较对照组有显著性差异。

上述结果表明大鼠连续灌服雄黄 $0.01\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 1,2个月或 $0.04, 0.17\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 1个月是相对安全的,大鼠肾脏毒性病变随着雄黄给药时间和剂量的增加而逐渐加重,具有明显的量-时-毒关系;砷对肾脏的影响主要损伤近曲小管,以水变性为主,并可引起血管扩张、充血和炎症细胞浸润,这与Liu等^[11]的研究结果相近,说明近曲小管可能是砷毒性作用的主要靶部位。

[参考文献]

- [1] 顾晶晶,黄珍祯,谷颖敏,等. 雄黄可溶性砷和价态砷与小鼠急性毒性关系的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):230.
- [2] 黄义娜,王盛民,詹源文,等. 雄黄超高压射流粉表征及抑菌效果[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(20):21.
- [3] 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,2010:401.
- [4] 张娟,刘启德,汤毅珊. 雄黄中砷对大鼠肝肾功能的影响[J]. 广州中医药大学学报,2010,27(4):375.
- [5] Wu J, Shao Y, Liu J, et al. The medicinal use of realgar (As_4S_4) and its recent development as an anticancer agent[J]. J Ethnopharmacol, 2011,135(3):595.
- [6] 李春英,梁爱华,王金华,等. 雄黄砷的蓄积性研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(14):1895.
- [7] Liu J, Lu Y, Wu Q, et al. Mineral arsenicals in traditional medicines: orpiment, realgar, and arsenolite[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2008,326(2):363.
- [8] 高双荣,梁爱华,易艳,等. 雄黄中砷的不同形态及其毒性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(24):243.
- [9] Oguri T, Yoshinaga J, Tao H, et al. Daily intake of inorganic arsenic and some organic arsenic species of Japanese subjects[J]. Food Chem Toxicol, 2012,50(8):2663.
- [10] Naranmandura H, Xu S, Sawata T, et al. Mitochondria are the main target organelle for trivalent monomethylarsonous acid [MMA(III)]-induced cytotoxicity[J]. Chem Res Toxicol, 2011,24(7):1094.
- [11] Liu J, Liu Y, Goyer R A, et al. Metallothionein-I/II null mice are more sensitive than wild-type mice to the hepatotoxic and nephrotoxic effects of chronic oral or injected inorganic arsenicals[J]. Toxicological Sciences, 2000,55(2):460.

[责任编辑 聂淑琴]