

益母草醇提组分致大鼠肾毒性病理损伤机制研究

黄伟^{1,2}, 孙蓉^{1*}

(1. 山东省中医药研究院, 济南 250014; 2. 山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的: 探讨长期大量给予益母草醇提组分致大鼠肾毒性的病理损伤机制。方法: 按 45 d 毒性实验方法, 进行益母草醇提组分高、中、低剂量组的肾组织病理学检查; 检测大鼠血清丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 以及总巯基 (-SH) 的含量和活性。结果: 病理组织学检查发现, 益母草醇提组分高、中、低剂量组均可见不同程度的肾小管损伤, 且损伤程度随剂量增加而加重, 与空白组相比有明显差异; 血清酶学检测发现, 益母草醇提组分可导致 MDA、总-SH 含量增加, SOD, GSH-Px 活性下降, GSH 含量降低, 上述变化随剂量的增加而逐渐加重, 与空白组相比有明显差异。结论: 氧化损伤机制可能是益母草导致肾毒性病理损伤的机制之一。

[关键词] 益母草; 95% 乙醇; 毒性; 病理损伤机制

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0111-04

Pathological Damage Mechanism of Rats' Nephrotoxicity caused by Alcohol Extracted Components of Herba Leonuri

HUANG Wei^{1,2}, SUN Rong^{1*}

(1. Shandong Research Academy of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China;
2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[Abstract] Objective: To study the pathological damage mechanism of rats, nephrotoxicity after taking a large dose of alcohol extracted components of herba leonuri for a long time. **Method:** According to 45-day toxicity by experimental methods, to carry out the histopathologic examination of nephridial tissue; to detect the content of MDA, total SH, GSH and activity of SOD, GSH-Px in serum. **Result:** Histopathological examination shows: the high, medium and low dose group of alcohol extracted components of herba leonuri can induce the different degrees of renal tubular injury, and the damage gradually aggravates with dose increasing; can induce the content of total-SH, MDA in serum increasing, GSH in serum decreasing and the activity of SOD, GSH-Px decreasing in serum, and the above-mentioned change gradually aggravates with dose increasing, and it is the obvious discrepancy compared with control group. **Conclusion:** The oxidative damage mechanism may be one of the pathological damage mechanisms caused by Herba Leonuri.

[Key words] Herba Leonuri; 95% ethanol; nephrotoxicity; pathological damage mechanism

益母草为唇形科植物益母草 *Leonurus japonicus* Houtt. 的干燥地上部分, 是传统的中药材, 具有活血

祛瘀, 调经消水之功, 素有“血家圣药”、“经产良药”之称^[1], 多用于妇科疾病及肾炎水肿、肾病综合征等肾脏疾病的治疗^[2]。益母草虽在《神农本草经》中列为上品, 但近年来因使用益母草而引起药物性肾损害的临床报道日益增多, 已引起人们高度重视^[3-4]。有研究发现益母草使用剂量过大, 或长时间应用, 可对肾间质、肾小管产生肾毒性^[5], 也有大剂量服用益母草中毒致血尿的临床报道^[6], 所以益母

[收稿日期] 20100226(004)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (2009CB522802); 国家中医药管理局中医药科学技术研究专项 (国中医药科 2004ZX00)

[通讯作者] * 孙蓉, 硕士生导师, 研究员, 博士, Tel: 0531-82949843, E-mail: sunrong107@163.com

草的肾脏毒性逐渐引起重视。但对肾毒性的报告以临床症状描述为多,而实验研究为少。笔者在益母草肾毒性方面做了大量的实验研究:在“复方配伍对益母草致大鼠肾毒性的减毒作用”^[7]研究中发现,益母草提取物在尿常规、尿微量蛋白、肾功能和肾组织损伤等方面对大鼠有明显的毒性作用,与临床不良反应报道相一致,合理配伍可降低益母草导致的大鼠实验性肾损伤程度,降低其肾毒性;在文献[8]中发现,益母草醇提组分比水煎剂的毒性大,且其毒性大小与所含生物碱类成分含量密切相关;在“益母草醇提取物对大鼠肾毒性损伤作用研究”^[9]中发现,益母草醇提取物长期给药后可导致大鼠明显的肾毒性损伤。本研究探讨了富含生物碱类成分的益母草醇提组分对大鼠肾毒性的病理损伤机制。

1 材料

1.1 药物与试剂 益母草购自河北省安国药材批发市场(批号 20050720),经山东中医药大学学生药学教研室张芳鉴定为唇形科植物益母草 *Leonurus japonicus* Houtt. 的干燥地上部分;益母草醇提取组分,含生药量为 $6.59 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,测得总生物碱为 $24.36 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,临用时用水稀释到恰当体积灌胃给药;丙二醛(MDA)、总巯基(-SH)、还原型谷胱甘肽(GSH)含量测定试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 动物 Wistar 大鼠,SPF 级,雌雄各半,体重 $110 \sim 130 \text{ g}$,适龄、健康,共 120 只,购自山东大学实验动物中心,合格证号 scxk(鲁)20030004。

1.3 仪器 德国贝尔 560 全自动生化分析仪, T21 型分光光度计, HH-S 恒温水浴锅, 高速离心机。

2 方法

2.1 样品制备 准确称取干品益母草,加入 15 倍

滤液,回收乙醇至无醇味,混匀,浓缩,即得。

2.2 动物分组与剂量设计 上述大鼠按体重随机分为 4 组:对照组,益母草醇提取物高、中、低剂量组。益母草醇提取物按含生药量计,经口急性毒性试验,测得 $\text{LD}_{50} 101.33 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,高、中、低剂量组分别为 $120, 60, 30 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,均按 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 鼠重体积灌胃,对照组给等体积蒸馏水灌胃。

2.3 指标检测 取自凝血分离血清,按照试剂盒说明书,测定血清 MDA, -SH, GSH 含量和 SOD, GSH-Px 活性;福尔马林固定,作病理学检查。

2.4 统计学方法 数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件对各组参数进行单因素方差分析。进行组间比较, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 病理组织学检查 益母草醇提取物高剂量组大鼠肾髓质的间质中有纤维组织增生,肾小管上皮明显浊肿,肾小管管腔内偶见嗜伊红物质,肾近端小管直段,上皮细胞严重坏死,细胞核消失;中剂量组大鼠肾近端小管直段,上皮细胞严重坏死,或细胞轮廓尚保存,核染色质固缩深染;低剂量组肾小管上皮浊肿,无明显间质纤维组织增生,肾小球均无明显病变。见图 1。

3.2 病理损伤机制探讨

3.2.1 TBA 比色法测定 MDA 含量 结果见表 1。益母草醇提取物 3 个剂量组大鼠血 MDA 含量明显增高,与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.2.2 SOD 活性 见表 2。益母草醇提取物高、中、低剂量组大鼠血清 SOD 活性明显降低,与对照组比较分别呈极显著性、非常显著性和显著性差异;益母草醇提取物高剂量组与低剂量组之间比较有显著性差异,说明呈现一定的剂量依赖关系。

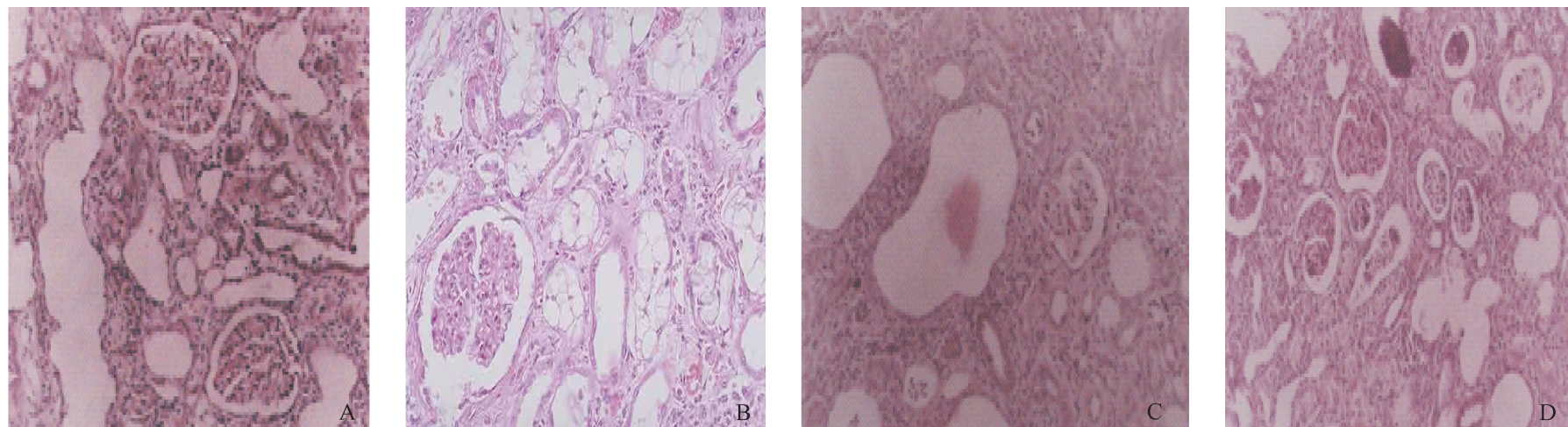


图 1 益母草醇提取物对大鼠肾毒性病理组织学检查(HE 染色, $\times 100$)

A. 空白组; B. 益母草醇提取物 $120 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; C. 益母草醇提取物 $60 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; D. 益母草醇提取物 $30 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组。

表 1 益母草醇提组分对大鼠肾毒性血清 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=30$)

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	MDA / $nmol \cdot mL^{-1}$
对照	-	0.39 \pm 0.08
益母草	120	0.53 \pm 0.10 ²⁾
	60	0.49 \pm 0.09 ¹⁾
	30	0.46 \pm 0.07 ¹⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.01$ (下同)。

表 2 益母草醇提取物对大鼠肾毒性血清 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	SOD / $U \cdot mL^{-1}$
对照	30	-	526.00 \pm 101.65
益母草	23	120	376.30 \pm 49.44 ³⁾
	30	60	417.20 \pm 55.45 ²⁾
	30	30	436.70 \pm 63.21 ¹⁾

3.2.3 总-SH 含量 结果进行组间 t 检验,见表 3。益母草醇提取物高、中、低剂量组大鼠血清-SH 含量明显增高,与对照组比较分别呈极显著性、非常显著性和显著性差异,益母草醇提取物高剂量组与中、低剂量组之间比较分别有显著性和极显著性,说明呈现一定的剂量依赖关系。

表 3 益母草醇提取物对大鼠肾毒性血清总-SH 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	-SH / $\mu mol \cdot L^{-1}$
对照	30	-	3.39 \pm 0.66
益母草	23	120	5.83 \pm 0.84 ³⁾
	30	60	4.93 \pm 0.95 ²⁾
	30	30	4.25 \pm 0.72 ¹⁾

3.2.4 GSH 含量 结果进行组间 t 检验,见表 4。益母草醇提取物高、中、低剂量组大鼠血 GSH 含量明显降低,与对照组比较分别呈极显著性、非常显著性和显著性差异,益母草醇提取物高剂量组与中、低剂量组之间比较分别有非常显著性和极显著性,说明呈现一定的剂量依赖关系。

表 4 益母草醇提取物对大鼠肾毒性血清 GSH 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	GSH / $mg \cdot L^{-1}$
对照	30	-	417.14 \pm 68.85
益母草	23	120	247.08 \pm 43.24 ³⁾
	30	60	313.19 \pm 48.24 ²⁾
	30	30	352.71 \pm 44.78 ¹⁾

3.2.5 GSH-Px 活性 结果进行组间 t 检验,见表 5。益母草醇提取物高、中、低剂量组大鼠血 GSH-Px 含量明显降低,与对照组比较分别呈极显著性、非常显著性和显著性差异,益母草醇提取物高剂量组与

中、低剂量组之间比较分别有显著性和非常显著性,说明呈现一定的剂量依赖关系。

表 5 益母草醇提取物对大鼠肾毒性血清 GSH-Px 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	GSH-Px / $U \cdot mL^{-1}$
对照	30	-	57.40 \pm 8.90
益母草	23	120	40.67 \pm 5.90 ³⁾
	30	60	47.09 \pm 4.53 ²⁾
	30	30	50.07 \pm 6.23 ¹⁾

4 讨论

中药肾损害是目前国内外研究热点课题,马兜铃样肾毒性的研究取得了较大的进展。其导致肾损害的毒性成分和肾损害的毒性机制均开展了较系统和深入的研究^[10]。益母草在近几年有大量的临床泌尿系统不良反应的报道和比较浅显的实验研究,由于目前证实益母草不含“马兜铃酸性”成分,那么其导致肾损害的成分和机制就成为目前值得探索和研究的课题。生物碱是益母草具有生物活性的一类成分^[11],并且益母草总生物碱已经有中成药上市,因此关于生物碱成分是否也是益母草导致肾毒性的主要成分,对其肾脏不良反应追踪和毒副作用的研究就显得日益重要。为此,笔者通过醇提富集了生物碱,观察了长期、大量给予益母草醇提组分对大鼠肾毒性损伤的作用和程度。氧化损伤机制是中药毒性损伤的主要机制,也是国内外毒性机制研究的热点问题,近代对益母草肾毒性机制的实验研究很少,故选择了与氧化损伤机制密切相关的指标 (MDA, 总-SH, GSH, SOD, GSH-Px) 作为评价指标^[12],初步探讨了益母草肾毒性损伤的病理机制。

本研究表明益母草醇提组分经过连续给药 45 d 后,可导致大鼠明显的肾毒性损伤,病理组织学检查可见不同程度的肾小管损伤;导致血中 MDA, 总-SH, GSH 含量增加, SOD, GSH-Px 活性下降,且上述变化随剂量的增加而逐渐加重,与对照组相比有明显差异。提示益母草醇提组分长期给药后可导致大鼠明显的肾毒性损伤,其损伤程度呈现一定的剂量依赖关系,与益母草生物碱的含量呈正相关性,可初步判定生物碱类成分是益母草导致肾毒性的主要物质基础;氧化损伤机制可能是其导致肾毒性的机制之一。

中药的毒性是在中医理论指导下,临床辨证用药和临床功效的表征过程中逐渐被发现和认识的^[13],因此益母草肾毒性的研究不能孤立地就毒性

论毒性,应当放在功效和证候的背景下进行综合评价和科学认知。生物碱类成分是益母草产生活性和导致肾毒性的主要物质基础,如何制定临床上的“有效治疗窗”和“药物安全窗”,根据体内过程制订其发挥生物学效应的最低限度和安全限度,以及益母草致大鼠肾毒性损伤的其他毒性物质基础和其他损伤机制均有待于进一步研究和探讨。以期为临床安全、有效、合理用药提供依据。

[参考文献]

[1] 晁志,周秀佳. 益母草类中药的研究概况和进展[J]. 中草药, 1998, 29(6) : 414.

[2] 罗毅,鲁建武,刘红燕,等. 益母草氯仿提取物对大鼠的肝肾毒性评价[J]. 山西医药杂志, 2009, 38(9) : 779.

[3] 刘建华. HL 中毒致血尿的辨证治疗例析[J]. 实用中医内科杂志, 2002, 16(3) : 166.

[4] 贾祥生. HL 中毒致死 1 例[J]. 实用中医内科杂志, 1989, 3(3) : 38.

[5] 蔡浙毅. 益母草对肾功能及其组织形态影响的动物实验研究[J]. 上海中医药杂志, 2000(11) : 37.

[6] 孙蓉,吴旭东,刘建伟,等. 雷公藤、关木通、益母草对大鼠肾毒性的比较研究[J]. 中药药理与临床, 2005, 21(2) : 26.

[7] 孙蓉,孙玲,吴旭东,等. 复方配伍对益母草致大鼠肾毒性的减毒作用[J]. 中国药物警戒, 2005, 2(3) : 144. .

[8] 孙蓉,黄伟,张作平. 益母草不同组分对小鼠急性毒性实验比较研究[J]. 中国药物警戒, 2010, 7(2) : 65.

[9] 吕丽莉,黄伟,于晓,等. 益母草醇提取物对大鼠肾毒性损伤作用研究[J]. 中国药物警戒, 2009, 6(9) : 513.

[10] 郭晓庄. 有毒中草药大词典[M]. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1992: 512.

[11] 安伟建. 中药益母草有效成分提取和测定方法的研究进展[J]. 天津药学, 2003, 15(3) : 68.

[12] 孙蓉,李素君,黄伟,等. 氧化损伤相关指标在中药肝毒性损伤机制中作用与研究进展[J]. 中药药理与临床, 2009, 25(1) : 80.

[13] 孙蓉,黄伟,鲍志焯,等. 基于功效和物质基础的半夏毒性研究进展[J]. 中国药物警戒, 2010, 7(1) : 37.

[责任编辑 邹晓翠]