

关木通提取物诱导的大鼠慢性肾毒性变化及 与血药浓度的关系

林爱华¹, 刘奕明^{2*}, 欧润妹², 黄海定², 杨海峰³

(广州中医药大学第二附属医院 1. 中药制剂学实验室, 2. 中心实验室, 3. 病理科, 广州 510120)

[摘要] 目的: 观察长期应用不同剂量关木通提取物诱导的大鼠肾毒性的变化, 并分析其与马兜铃酸 A 血药浓度的关系。方法: SD 大鼠随机分为 5 组: 正常对照组, 低盐对照组, 低、中、高剂量组, 于给药后第 4 和 6 周观察大鼠肾功能和肾组织形态学的变化。马兜铃酸 A 血药浓度采用液质联用(LC/MS/MS)法测定。结果: 与低盐对照组相比, 药后第 2 周低、中、高剂量组尿量增多, 第 4 周时尿量减少, 低、中剂量组其他各指标无明显变化, 高剂量组尿蛋白和尿素氮(BUN)升高; 药后第 6 周时, 高剂量组尿量进一步减少, 尿蛋白、肌酐(Crea)和 BUN 明显升高; 病理表现为肾小管细胞空泡变性及小动脉和肾间质病变; 高剂量组各种变化较低、中剂量组更为明显。各项检测指标在 2 个对照组间差异无统计学意义。药后 6 周血浆中马兜铃酸 A 浓度极低。结论: 大鼠长期应用关木通提取物可导致肾脏功能和组织学病变, 且病变程度与用药时间和剂量有明显的相关性, 而与马兜铃酸 A 血药浓度可能无关。

[关键词] 关木通; 马兜铃酸 A; 大鼠; 肾毒性; 血药浓度

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0139-05

Changes of *Caulis Aristolochiae Manshuriensis* Extract-induced Chronic Nephrotoxicity and Relationship between Changes and Plasma Concentration

LIN Ai-hua, LIU Yi-ming^{*}, OU Run-mei, HUANG Hai-ding, YANG Hai-feng

(The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the renal changes of aristolochic acid-induced nephrotoxicity by long-term using different dose of *Caulis Aristolochiae Manshuriensis* Extract (CAME) in rats, and investigate the relationship between the changes and blood aristolochic acid-A concentration. **Method:** Male SD rats were randomized into 5 groups: normal diet control group, low-salt diet control group, Low-, Mid-, and High-dose groups. Renal function and morphological changes in renal tissue were observed at 4 and 6 weeks after treatment with CAME, respectively. The aristolochic acid-A concentration in blood was determined by LC-MS-MS method. **Result:** Compared with low-salt diet control group, the urine volumes in 3 groups were increased at the 2nd weeks. At the 4th weeks, the urine volumes were decreased; other renal changes in low- and mid-dose groups were not obvious; the levels of urine protein and BUN were remarkably increased in high-dose group. At the 6th weeks, the urine volume was decreased in high-dose group and the levels of urine protein, Crea and BUN were significantly increased. Morphologic changes consisted of vacuolization of renal tubular cells, hyalinization of small arterioles and the light renal interstitial fibrosis. All the injury changes in High-dose group were more severe than those in low- and mid-dose groups. The parameters in two control groups had no statistical significance. The plasma aristolochic acid-A concentration was very low. **Conclusion:** Long-term use of CAME in rats results in renal function and morphological changes, which

[收稿日期] 20100412(004)

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(06301332)

[第一作者] 林爱华, 博士, 副研究员, 研究方向: 药物制剂及其生物有效性研究, Tel: 020-39318571, E-mail: linah76@126.com

[通讯作者] * 刘奕明, 博士, 副研究员, 研究方向: 中药药理与药代动力学, Tel: 020-39318778, E-mail: lyiming2000@163.com

correlated with time and dosage of used CAME and might be independence to plasma aristolochic acid-A concentration.

[Key words] *Caulis Aristolochiae manshuriensis*; aristolochic acid-A; rats; nephrotoxicity; plasma concentration

关木通具有清心火、利小便、通经下乳的功效,在临床常用于口舌生疮、心烦尿赤、水肿、热淋涩痛等症。近年来马兜铃酸肾病的报道使得许多国家禁止使用含马兜铃酸的关木通、广防己等。然而马兜铃酸肾病仍时有发生,特别是在亚洲和巴尔干地区^[1]。马兜铃酸 A 在马兜铃酸成分中含量较高,是导致肾损害的主要毒性成分^[2-3]。有关马兜铃酸导致急性肾毒性的临床和实验研究较多,但对于其引起的慢性肾毒性变化及与马兜铃酸 A 血药浓度的关系尚未完全阐明。本文在建立大鼠慢性肾毒性动物模型的基础上,观察了马兜铃酸诱导的慢性肾毒性变化,并对其与血药浓度的关系进行分析,为进一步认识其肾毒性提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器 马兜铃酸 A 对照品(纯度 99.8%),中国药品生物制品检定所提供,批号 110746-200406;关木通药材经鉴定为东北马兜铃 *Aristolochia manshuriensis* Kom 的干燥藤茎;羧甲基纤维素钠(CMC-Na),上海益壮工贸公司产品。Modular PPI 生化分析仪,Allegra™ X-12R 离心机,贝克曼-库尔特公司。

关木通提取物的制备:称取关木通生药饮片 200 g,加入 95%乙醇 2 500 mL,浸泡 1 h,加热至微沸,回流提取 2 h,过滤,滤渣中再加入 95%乙醇 1 600 mL 回流提取 22 h,过滤后合并 2 次的提取液,减压浓缩至浸膏状,4 ℃ 保存备用。经测定关木通提取物中马兜铃酸 A 质量分数为 17.98 mg · g⁻¹。使用前,将称取的一定量的关木通浸膏在水浴(约 50 ℃)条件下加入 0.4%的 CMC-Na 溶液,混匀,制得所需浓度的含药混悬液。

1.2 动物 SD 大鼠,雄性,SPF 级,体重(262 ± 27)g,广东省医学实验动物中心提供,合格证号 0042894。SPF 级低盐饲料(钠含量 0.05%)和普通饲料购自广东省医学实验动物中心。

1.3 方 法

1.3.1 关木通提取物诱导大鼠慢性肾毒性及标本采集 大鼠随机分为 5 组:正常对照组,低盐对照

组,低(AA-L组)、中(AA-M组)、高(AA-H组)剂量组,剂量按马兜铃酸 A 计算分别为 6, 12, 24 mg · kg⁻¹(即相当于含生药 5.2, 10.4, 20.8 g · kg⁻¹),每组 5 只。采用低盐饮食或普通饮食喂养 1 周后开始试验。低、中、高剂量组分别按剂量灌胃不同浓度的关木通提取物;对照组灌胃等量 CMC-Na 溶液;连续给药 1 周(每天 1 次),停药 1 周,隔周给药,试验共进行 6 周。每 2 周称取体重,调整关木通提取物用量。除正常对照组进行普通饮食外,其他各组均采用低盐饮食。

于给药前、给药后 2, 4, 6 周,收集 16 h 尿液,记录尿量;同时药后 4, 6 周时检测尿蛋白,并进行眼眶采血,离心分取血浆,用于检测血肌酐(Crea)和尿素氮(BUN);试验结束时(药后 6 周),收集全血,用于测定马兜铃酸 A 血药浓度,并处死大鼠,取肾脏纵切后固定于 10%中性甲醛溶液,用于病理检查。

1.3.2 指标检测 血肌酐 Crea 采用碱性苦味酸法测定,尿素氮 BUN 采用尿素酶法测定,尿蛋白采用比色法测定;马兜铃酸 A 血药浓度测定采用已建立的液质联用(LC-MS-MS)法^[4];肾组织经 10%甲醛固定后作石蜡包埋,常规石蜡切片,作 HE 和 PAS 染色,进行肾脏病理学观察。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析,多组间均数比较采用方差分析(ANOVA),两两比较用 LSD 法。 $P < 0.05$ 有显著性差异。

2 结 果

2.1 体重变化 以每只大鼠给药后与给药前体重相比所得的相对体重(即体重增长倍数)为指标反映实验期间大鼠的体重变化。正常对照组和低盐对照组大鼠在试验期间体重进行性增加,AA-L 组体重明显增长,AA-M 组体重增长缓慢之后略有下降,AA-H 组则体重未见增加且明显下降。AA-L, AA-M 和 AA-H 组大鼠在药后 2, 4, 6 周体重显著低于低盐对照组,且差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);在药后第 4, 6 周,AA-M 和 AA-H 组大鼠体重显著低于 AA-L 组($P < 0.01$),且 AA-H 组下降更为明显,表明给药后大鼠体重变化与剂量相关(图 1)。

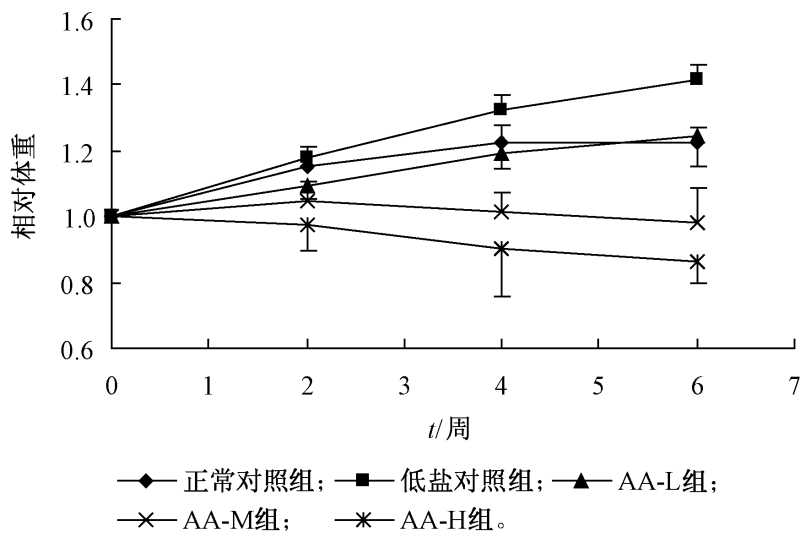


图 1 大鼠灌胃关木通提取物后体重的变化 (均±s, n=5)

表 1 大鼠灌胃关木通提取物后尿量的变化比较 (均±s, n=5)

组别	剂量 /mg · kg ⁻¹	给药前	药后 2 周	药后 4 周	药后 6 周
正常对照	-	7.3 ±1.3	11.2 ±2.5	7.0 ±1.8	9.6 ±1.8
低盐对照	-	7.4 ±1.1	8.3 ±2.2	6.9 ±2.0	9.2 ±1.0
AA-L	6	7.2 ±2.3	15.1 ±2.1 ²⁾	8.2 ±2.2	16.5 ±2.5 ²⁾
AA-M	12	9.3 ±2.4	17.7 ±4.8 ²⁾	12.8 ±3.0 ²⁾	16.0 ±2.2 ²⁾
AA-H	24	8.6 ±2.5	16.7 ±1.7 ²⁾	11.0 ±2.5 ¹⁾	10.6 ±2.8 ³⁾

注:与低盐对照组比较¹⁾ P<0.05, ²⁾ P<0.01;与 AA-L, AA-M 组比较³⁾ P<0.01(表 2~4 同)。

表 2 大鼠灌胃关木通提取物后尿蛋白的变化比较 (均±s, n=5) mg

组别	剂量 /mg · kg ⁻¹	给药前	药后 4 周	药后 6 周
正常对照	-	146.8 ±59.0	161.0 ±52.7	177.3 ±67.8
低盐对照	-	115.9 ±18.4	172.7 ±51.6	134.0 ±75.0
AA-L	6	122.9 ±50.5	118.9 ±38.9	132.6 ±17.0
AA-M	12	135.1 ±53.5	210.8 ±55.5	364.3 ±69.9 ^{2,3)}
AA-H	24	132.5 ±53.4	394.8 ±111.1 ^{2,3)}	422.7 ±111.9 ^{2,3)}

2.3 肾功能变化 给大鼠灌胃关木通提取物后, AA-L 和 AA-M 组 Crea, BUN 均略有升高, 但与对照组相比无明显差异; AA-H 组 Crea 升高, 在药后第 6 周明显高于对照组; BUN 明显升高, 在药后第 4 和 6 周与对照组相比有显著性统计学差异, 且明显高于 AA-L 和 AA-M 组, 见表 3~4。

表 3 大鼠灌胃关木通提取物后肌酐 Crea 的变化比较 (均±s, n=5)

组别	剂量 /mg · kg ⁻¹	给药前	药后 4 周	药后 6 周
正常对照	-	37.3 ±4.3	46.8 ±4.3	45.0 ±13.0
低盐对照	-	34.8 ±7.9	45.8 ±3.9	42.0 ±7.9
AA-L	6	40.0 ±6.7	43.8 ±1.3	46.3 ±6.9
AA-M	12	37.5 ±1.7	40.5 ±4.4	45.3 ±5.4
AA-H	24	34.0 ±4.7	55.5 ±22.4	61.5 ±18.5 ¹⁾

2.2 尿液学变化 两对照组大鼠各指标无明显变化; 给药后第 2 周, 3 个剂量组大鼠尿量均明显增多, 与对照组相比差异均有统计学意义; 第 4 周时 3 组尿量均有所减少, 但 AA-M, AA-H 组仍明显高于对照组, AA-H 组尿蛋白明显高于对照组、AA-L 和 AA-M 组; 第 6 周时 AA-L, AA-M 组尿量增加且明显高于对照组, 而 AA-H 组继续减少并明显低于 AA-L 和 AA-M 组, AA-M, AA-H 组尿蛋白明显升高, 与对照组和 AA-L 组相比均有统计学差异。结果见表 1~2。

表 4 大鼠灌胃关木通提取物后尿素氮 BUN 的变化比较 (均±s, n=5)

组别	剂量 /mg · kg ⁻¹	给药前	药后 4 周	药后 6 周
正常对照	-	5.0 ±0.5	8.8 ±1.9	8.4 ±2.5
低盐对照	-	5.8 ±1.6	7.6 ±1.4	7.3 ±0.4
AA-L	6	6.2 ±0.5	7.0 ±0.9	9.4 ±1.3
AA-M	12	5.6 ±0.7	7.5 ±2.5	8.2 ±0.7
AA-H	24	5.8 ±0.9	11.0 ±3.1 ^{1,4)}	12.7 ±2.8 ^{2,4)}

2.4 肾组织病理改变 正常对照组和低盐对照组大鼠肾脏的形态学未发生明显改变。AA-L 组肾小管弥漫性轻度颗粒状变性, 局灶中度加重, 小灶性肾小管上皮细胞坏死脱落, 偶见裸基底膜现象, 病变肾小管累及 < 10% 皮质区面积; AA-M 组肾小管弥漫性颗粒状变性、空泡变性, 片状肾小管上皮细胞坏死脱落, 呈裸基底膜现象, 累及约 20%~30% 皮质区面积, 可见小灶性单个核炎症细胞浸润; AA-H 组肾小管弥漫性颗粒状变性、空泡变性, 弥漫性肾小管上皮细胞坏死脱落, 可见广泛性裸基底膜现象, 累及约 50%~60% 皮质区面积, 可见小灶性单个核炎症细胞浸润, 肾小动脉管壁轻度增厚。各组肾小球组织无明显病变。可见关木通提取物引起的肾毒性与剂量有明显相关性(图 2)。

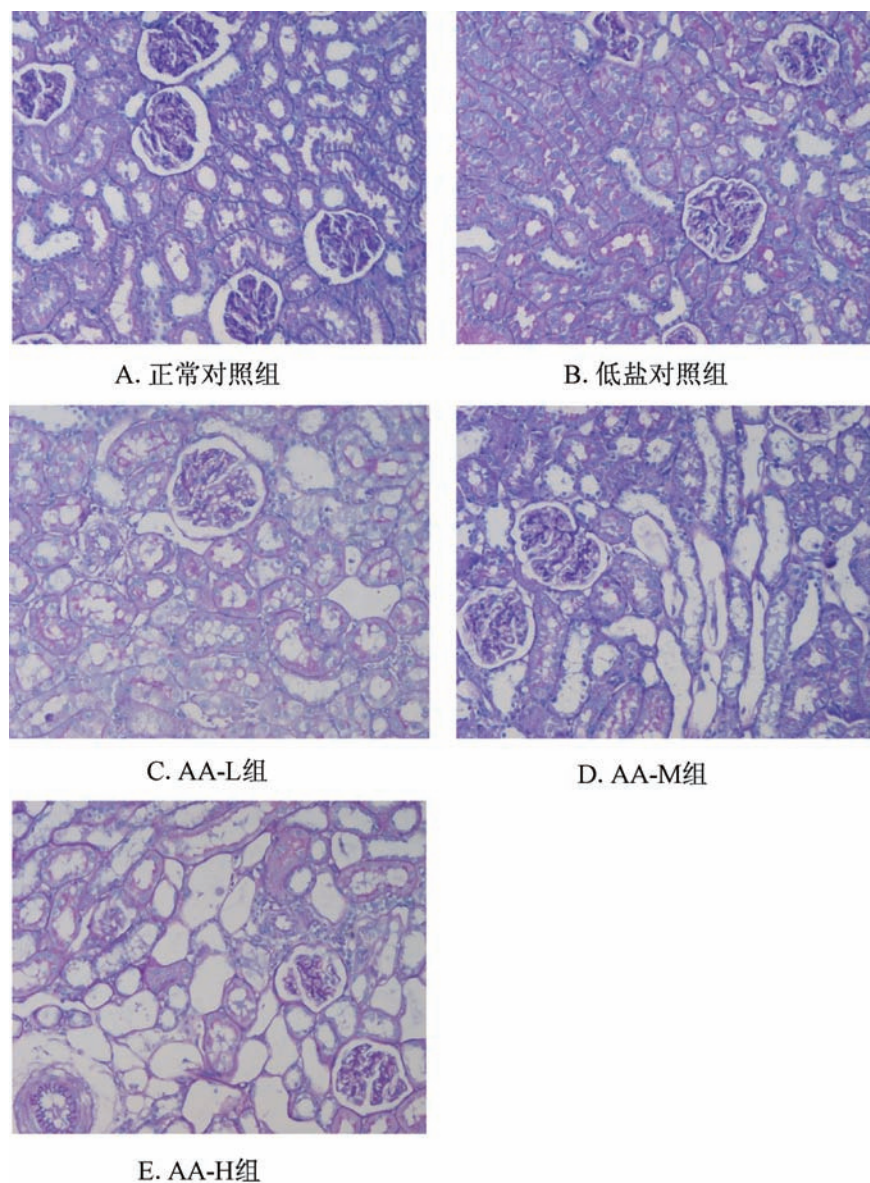


图 2 不同组别大鼠在药后 6 周肾组织的病理变化 (PAS, $\times 200$)

2.5 血药浓度及与肾毒性的关系 试验第 6 周(实验结束)时,采用 LC-MS-MS 方法测定血浆中马兜铃酸 A 浓度,结果发现仅高剂量组有一例样本测得浓度为 $8.7 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,其他样本均未测到(低于 $0.4 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),表明此时血浆中原型药物浓度极低,而从体重、生化、病理等各项指标可见各剂量组均有不同程度的肾损伤。因此,灌胃关木通提取物后大鼠肾毒性变化与剂量相关,而与血药浓度无直接相关性。

3 讨论

关于马兜铃酸慢性肾毒性动物模型的建立,已有文献^[5-6]报道采用长期腹腔内注射马兜铃酸或间断灌胃关木通醇提物,但所需时间较长(至少 4 个月)。1990 年 Rosen^[7]等在复制大鼠环孢素 A 慢性肾毒性模型时发现,给药同时给予钠缺乏饮食,可明显缩短模型复制时间,说明钠耗竭是建立模型的重要条件,机理可能在于钠耗竭激活了肾素-血管紧张素系统。因此有研究者探讨用关木通浸膏加低盐饮食建立大鼠慢性马兜铃酸肾病模型^[8],关木通浸膏(醇提)使用时以蒸馏水制成水溶液。然而在试验中我们发现浸膏加水后易呈团状或黏附于容器壁,难以均匀分散于水中,导致给药剂量不准确。因此

本试验采用分散均匀的关木通提取物的 CMC-Na 混悬液给大鼠灌胃,同时给予低盐饮食,结果 6 周后成功复制了马兜铃酸的肾毒性特征,且高剂量组病变特征比低、中剂量组更为明显,而两个对照组大鼠的肾功能和形态学均无明显变化,说明 CMC-Na 和低盐饮食本身对肾脏无影响。

大鼠在低盐饮食下,给予关木通提取物 2 周时尿量明显增多,低、中、高剂量组与对照组相比差异有显著性,提示 2 周时关木通提取物已导致肾小管功能出现损伤,使尿浓缩能力下降;第 6 周时低、中剂量组尿量与第 4 周相比略增加,而高剂量组进一步减少,分析可能由于此时大鼠肾脏出现明显的空泡变性,肾功能明显损伤,健存肾单位日渐减少导致尿量减少。血中尿素氮 BUN 和肌酐 Crea 能够反映肾小球的滤过功能,BUN 反应较敏感,而 Crea 的变化则较迟缓,但它的增高一般提示肾功能已严重受损。本实验中,AA-H 组药后 4 周时 BUN 即明显高于对照组和低、中剂量组,第 6 周时继续升高,Crea 不断升高,在第 6 周时明显高于对照组,表明关木通提取物对肾功能造成了严重损害。

马兜铃酸 A 作为马兜铃酸的主要成分之一,与关木通引起的肾毒性有密切关系。笔者^[4]曾考察大鼠灌胃 $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 马兜铃酸 A 的体内药动学,发现药物吸收迅速且消除较缓慢 $t_{1/2Z}$ 长达 13.96 h,提示药物易在体内蓄积;文献[2-3]认为马兜铃酸 A 导致的肾损害与其在体内的蓄积有关。然而在本试验中观察到了明显的肾毒性变化,却未测到血浆马兜铃酸 A 浓度,分析可能由于马兜铃酸 A 在体内代谢转化为马兜铃内酰胺 A,而其能够维持在一个稳定的血药浓度并在血液中蓄积^[9]。由此,关木通提取物导致大鼠肾脏功能和组织学病变,其病变程度与用药时间和剂量有明显的相关性,而与马兜铃酸 A 血药浓度可能无关。

[参考文献]

- [1] Debelle F D, Vanherweghem J L, Nortier J L. Aristolochic acid nephropathy: A worldwide problem[J]. *Kidney Int*, 2008, 74: 158.
- [2] Martinez M C, Nortier J, Vereerstraeten P, et al. Progression rate of Chinese herb nephropathy: impact of Aristolochia fangchi ingested dose [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2002, 17(3): 408.

(下转第 146 页)

冠心平对异丙肾上腺素致心肌缺血的试验研究

王道成^{1,2}, 李七一^{3*}, 朱萱萱⁴, 严士海⁴, 秦晓康⁴, 马俊杰⁴

(1. 南京中医药大学, 南京 210029; 2. 江苏省扬州市中医院, 江苏 扬州 225009;
3. 江苏省中医院, 南京 210029; 4. 江苏省中医院药理实验室, 南京 210029)

[摘要] 目的: 观察冠心平对异丙肾上腺素(ISO)致大鼠心肌缺血的影响。方法: 采取大鼠 scISO(30 mg·kg⁻¹)致急性心肌缺血模型, 观察冠心平对大鼠血清乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸磷酸激酶(CK)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响; 观察注射 ISO 后不同时间 J 点下降情况, 心肌病理损伤程度的影响; 结果: 冠心平各剂量组均可不同程度降低 LDH, CK 活力降低血清 MDA 水平, 升高 SOD 水平($P < 0.01$, $P < 0.05$); 明显抑制 ISO 引起的大鼠心电图 J 点下降($P < 0.05$, $P < 0.01$); 心肌病理损伤程度明显减轻。结论: 冠心平对 ISO 致大鼠心肌缺血模型具有明显保护作用。

[关键词] 冠心平; 异丙肾上腺素; J 点; 心肌缺血

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0143-04

An Experimental Study of Guanxinping on Isoprenaline-induced Myocardial Ischemia

WANG Dao-cheng^{1,2} LI Qi-yi^{3*}, ZHU Xuan-xuan⁴, YAN Shi-hai⁴, QIN Xiao-kang⁴, MA Jun-jie⁴

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;

2. Yangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yangzhou 225009, China;

3. Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;

4. Pharmacological Laboratory of Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] Objective: To observe the effect of Guanxinping on myocardial ischemic injury induced by isoprenaline in rats. **Method:** Rat myocardial ischemia was induced by subcutaneous injection of isoprenaline (30 mg·kg⁻¹). The effect of Guanxinping on the lactate dehydrogenase (LDH), serum creatine kinase (CK), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) was observed. The descent of J point at different time after injection of isoprenaline was examined, and pathological investigation of myocardial injury in rats was carried out. **Result:** Guanxinping could obviously inhibit the activities of serum CK, LDH, and MDA, enhance serum SOD activity($P < 0.01$, $P < 0.05$). Guanxinping could inhibit descent of J point in rat myocardial ischemia induced by isoprenaline($P < 0.05$, $P < 0.01$), and significantly reduce the extent of myocardial pathological damage. **Conclusion:** Guanxinping can obviously ameliorate myocardial ischemic injury induced by isoprenaline in rat.

[Key words] Guanxinping; isoprenaline; J point; myocardial ischemia

[收稿日期] 20100322(012)

[基金项目] 康缘中医药科技创新基金项目(HZ0803KY)

[第一作者] 王道成, 医学博士, 主任中医师, 研究方向: 中西医结合心血管病及其内科疾病的临床研究, Tel: 15195983259, 0514-82219306, E-mail: dr. wdc@163.com

[通讯作者] * 李七一, 教授, 博士研究生导师, 江苏省名中医, 主要从事中医心血管疾病的临床研究, Tel: 025-86612859