

· 大黄蒽醌类化合物毒性研究专题 ·

【编者按】蒽醌类化合物是大黄、何首乌、番泻叶等中药的主要活性成分。蒽醌类化合物具有抗菌、抗炎、抗肿瘤、保护肝肾、保护心血管、泻下等药理作用。然而，蒽醌类化合物也是引起肝、肾毒性的成分。大黄等中药的应用范围涉及多个医学领域，而且常被用于排毒养颜、降脂、减肥等中药的复方制剂中。大黄等中药的药理作用广泛、疗效佳，但许多患者长期大量服用可能会导致肝肾损伤，所以，大黄蒽醌类化合物对肝肾的毒性作用不容忽视。但是，有关蒽醌类化合物造成肝、肾毒性的作用机制尚未阐明。本课题组以多药耐药蛋白(ABCC)为切入点，选择ABCC功能、细胞内氧化应激状态、线粒体功能通路为主线，研究大黄蒽醌类化合物大黄素、芦荟大黄素和大黄酸对细胞及整体动物的潜在毒性作用机制，通过对比不同剂量的大黄蒽醌类化合物对青年及老年小鼠肝肾毒性差异，进一步阐明大黄素、芦荟大黄素和大黄酸毒性时-量与年龄差异性的微观毒理学机制。本专题研究了大黄蒽醌类化合物对小鼠肾脏的毒性作用及其分子机制。同时通过检索近年来与蒽醌类物质毒性有关的国内外文献，对其进行可能的毒性机制进行综述，并总结了减毒方法，为大黄的安全性深入研究和临床合理使用提供一定的参考。

大黄肝肾毒性及其减毒方法现代研究进展

胡樱凡¹，向丽¹，王平¹，林波²，孟宪丽^{1*}

(1. 成都中医药大学，成都 611137；2. 海南医学院第二附属医院，海口 570100)

【摘要】大黄作为临床上经常使用的药物，具有清热泻下、燥湿解毒、保肝利胆、抗炎、抗细菌内毒素和降糖等作用，其临床应用十分广泛，可用于防治便秘、黄疸、消化性溃疡和细菌性痢疾等多种疾病。然而近几年随着对大黄的研究不断深入，临床上滥用和误用大黄等情况频繁出现，其不良反应的报道日渐增多，因此其毒副作用也越来越受到国内外的关注。本文通过整理近年来关于大黄肝毒性、肾毒性的文章，主要从大黄的肝、肾毒性作用和毒理机制以及合理应用减毒这3个方面进行总结和讨论，对有关大黄肝毒性、肾毒性的药理、毒理研究进行简要综述，分别从肝肾生化指标、细胞凋亡、线粒体功能、基因和蛋白表达及信号通路等多个方面对大黄的肝、肾毒性进行了论述和阐释，并从炮制减毒和配伍减毒两方面对大黄的减毒方法进行概括总结，从而较为客观全面地理解大黄的肝肾毒性，阐明大黄造成肝肾损伤的毒理机制，为大黄炮制减毒和配伍减毒的机制提供一定的参考，使大黄在“毒性问题”方面更具说服力，从而对大黄的临床安全合理使用和深入研究提供进一步的理论依据。

【关键词】 大黄；肝毒性；肾毒性；减毒

【中图分类号】 R22；R242；R2-031；R285.5 【文献标识码】 A 【文章编号】 1005-9903(2019)11-0034-08

【doi】 10.13422/j.cnki.syfx.20191130

【网络出版地址】 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190218.1345.008.html>

【网络出版时间】 2019-02-19 13:44

Hepatotoxicity and Nephrotoxicity of Rhei Radix et Rhizoma and Its Attenuation Methods

HU Ying-fan¹, XIANG Li¹, WANG Ping¹, LIN Bo², MENG Xian-li^{1*}

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;
2. The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570100, China)

【Abstract】 Rhei Radix et Rhizoma is a common medicine in clinic, which is widely used for a variety of

【收稿日期】 20181119(014)

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81473419)

【第一作者】 胡樱凡，在读博士，从事中药药效与毒理学研究，E-mail: fine_hu@hotmail.com

【通信作者】 *孟宪丽，教授，从事中药药效与毒理学研究，E-mail: xlm999@cdutcm.edu.cn

diseases, such as constipation, jaundice, peptic ulcer, bacillary dysentery. In recent years, there have been many cases of clinical abuse and increasing number of adverse reactions about Rhei Radix et Rhizoma. Many reports concerned with its toxicity have drawn more and more attention at home and abroad. This review makes a brief summary on the toxicity research of Rhei Radix et Rhizoma in recent years in the aspects of hepatotoxicity, nephrotoxicity and its corresponding toxicity-controlling methods. Liver and kidney toxicity of Rhei Radix et Rhizoma was explained in various aspects, including liver and kidney biochemical indicators, apoptosis, mitochondrial function, gene and protein expression and signaling pathway. Besides, the attenuation methods of Rhei Radix et Rhizoma were summarized in aspects of processing and compatibility of traditional Chinese medicine. In conclusion, this study explains hepatotoxicity and nephrotoxicity of Rhei Radix et Rhizoma objectively, and explore relevant toxicological mechanisms, in order to provide proper reference for its further research and the safety of clinical use.

[Key words] Rhei Radix et Rhizoma; hepatotoxicity; nephrotoxicity; attenuation

大黄始载于《神农本草经》，为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum*，唐古特大黄 *R. tanguticum*，或药用大黄 *R. officinale* 的干燥根及根茎。其性寒，味苦，归脾胃、肝、大肠、心包经，功效清热凉血、泻火解毒、逐瘀攻积、泻下通便、利湿退黄^[1]。临床上，大黄作为常用药物，几千年来对多种疾病均有明显的治疗作用，广泛应用于如内科、外科、妇科、儿科、皮肤科、神经科和五官科等，将其称为“将军”“火参”“绵纹”等。18 世纪，大黄在欧洲被作为食物食用。19 世纪 30 年代，由于大黄作为馅饼配料在美国广受欢迎，又有“Pie plant”之称^[2]。大黄的主要有效成分为大黄蒽醌类成分，包括有大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄素甲醚、大黄酚等^[3-5]，具有抗菌、抗炎、抗肿瘤、保肝、保肾、心血管保护、免疫调节、清除自由基、催泻等生物活性^[4]。然而，大黄蒽醌类化合物同时也是引起肝、肾毒性的成分^[6-7]。据统计，在国家标准中，大约有 801 种复方中成药含有大黄，其应用范围包括多个医学领域，并且还涉及到排毒养颜、降脂、减肥类的中药复方中。大黄较好的口感在西式甜品中被当作一道风味配料。由于其具有良好的泻下作用，许多患者甚至健康的“爱美”人士，信奉“中药无毒”^[8]，听信偏方，未严格按照医嘱服用，导致过量服用大黄引起肝肾损伤。

据本草记载，大黄在《神农本草经》中列为下品，在《景岳全书》《本草便读》均记载为有毒之品。除此之外，大黄在其余绝大多数本草中均记载无毒。随着大黄的应用越来越广泛，关于大黄不良反应的报道屡见不鲜。肝脏和肾脏作为人体毒物代谢、转运和清除的主要器官，大黄对二者的毒性损伤尤为受到关注。因此，本文对近年来有关大黄的肝、肾毒性及其可能的毒理机制的现代研究进行综述，并

总结了相应的减毒方法，为大黄的深入探索和临床安全合理使用提供一定的参考。

1 大黄的肝毒性及其毒理机制

1.1 影响肝脏生化指标的毒性研究 由田^[9]给小鼠给予大黄灌胃，发现动物体内的丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和谷氨酰基转移酶 (γ -GT) 的含量会随着大黄给药量的增加而升高，说明其对小鼠肝脏毒性损伤具有剂量依赖性。且 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 大黄会引起小鼠肝脏脂肪变性，使肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的表达升高，这可能是大黄诱导肝损伤的毒理机制之一。

韦美金等^[10]研究长期 (30 d) 灌胃给予大鼠大黄素发现， $40, 80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 大黄素能升高大鼠血清中 ALT，总胆汁酸 (TBA)，直接胆红素 (DBIL) 和总胆红素 (TBIL) 的含量，上调肝脏中转运蛋白 P-糖蛋白 (P-gp)，多药耐药相关蛋白 3 (MRP3) 及下调肝脏中钠离子-牛黄胆酸共转运蛋白 (Ntcp) 和胆红素代谢酶 (UGT1A1) 的基因和蛋白表达水平。

WU 等^[11]研究了大黄素肝毒性和毒代动力学的性别差异，发现大黄素能导致大鼠的肝毒性，且雌性大鼠较雄性大鼠肝损害明显，同时大黄素能诱导 HepG2 细胞中多药耐药蛋白 MRP2 的表达升高，并降低 UDP-葡萄糖醛酸转移酶 2B7 (UGT2B7) mRNA 和蛋白表达水平。此外，长期服用大黄素可降低大鼠体内 UGT2B7 底物清除率，造成大黄素在大鼠体内蓄积，无明显性别差异，而雄性大鼠自发的 MRP2 的表达明显高于雌性。推测大黄肝毒性和毒代动力学的性别差异可能与 UGT2B7 和 MRP2 联合调节有关。

WANG 等^[12]研究发现，幼年和老年大鼠对大黄的耐受性有明显差异，老年大鼠对 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 大黄的肝脏毒性较幼年大鼠更为敏感，其中白细胞介素-6

(IL-6)和白细胞介素-8(IL-8)均有所增长,并且在肝窦区出现了淋巴细胞的浸润和枯否细胞的活化,推测其毒理机制可能是通过白细胞介素介导炎症反应,这提示老年人用大黄时需严格控制用量和时间。此外。其还观察到大黄具有保肝和肝毒性的双向作用,将不同剂量的大黄提取物分别给予正常大鼠和四氯化碳(CCl_4)所致肝损伤大鼠后,在高剂量的情况下,大黄提取物对正常大鼠及肝损伤大鼠均产生毒性作用,而低剂量的大黄提取物对 CCl_4 所致肝损伤起保护作用,可能肝细胞纤维化也是作为大黄诱导肝毒性的毒理机制之一^[13]。王艳辉等^[14]发现 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的大黄能引起血清透明质酸(HA),层黏蛋白(LN),球蛋白(GLO)和转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)升高,而这些指标与肝纤维化高度相关^[15]。

王建平^[16]以 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 大黄为小鼠的致毒剂量,对大黄鞣质部位进行了小鼠体内毒性实验研究。发现小鼠肝脏在给药后中,体内的 ALT 和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)升高,病变肝小叶中央静脉周围部分肝细胞体积增大,轻度水肿,胞浆疏松淡染,病变严重者将分布为散在的点状坏死,初步说明大黄中的鞣质部位具有潜在的肝毒性。更深入的研究发现,缩合鞣质具有保护肝脏的作用,水解鞣质具有损害肝脏的作用,而这两种鞣质都同时存在于大黄中^[17]。这提示大黄保肝和肝毒性的双向作用物质基础之一是大黄的鞣质部位。

全云云等^[18]研究发现芦荟大黄素可引起斑马鱼肝组织细胞形态改变,组织大面积坏死,明显降低斑马鱼体内 ALT,AST,GSH 的活力以及显著升高 TBIL 含量。

汪祺等^[19]研究发现大黄素可通过抑制 UGT1A1 酶的活性诱导胆红素代谢异常,从而引发肝毒性的潜在危险。

雷湘等^[20]在小鼠急性毒性实验研究中发现,大黄素会使中毒小鼠肝脏肿大,肝细胞和细胞间隙内均有瘀血。

1.2 影响细胞凋亡途径的毒性研究 刘德明等^[21-22]探讨了大黄素对人正常肝细胞 L02 和 HepG2 细胞的毒性作用及机制,发现大黄素在 $20, 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 下,对 L02 细胞具有明显的细胞毒性,而 $15, 30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的大黄素能抑制 HepG2 细胞的细胞增殖,均呈浓度依赖性,大黄素能降低细胞线粒体膜电位,显著升高细胞内 ROS 水平。此外,大黄素还能够激活已剪切的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cleaved Caspases)-8,9,3 和多聚 ADP-核糖

聚合酶(PARP)蛋白的表达,诱导 HepG2 细胞早期和晚期凋亡。推测大黄素的毒性作用机制可能是通过激活线粒体 Caspase 通路诱导 L02 细胞和 HepG2 细胞的细胞凋亡途径实现的。

KoraMagazi 等^[23]研究发现大黄酸能通过诱导内质网应激能力,Caspase-4 途径和胞内钙离子从而触发人源肝 HL-7702 细胞的细胞凋亡。

卫培峰等^[24]对小鼠连续灌胃 4 周大黄酚后发现大黄酚可显著致使小鼠肝细胞凋亡。

1.3 影响肝微粒体酶系统和线粒体功能的毒性研究 王来友等^[25]发现大黄素在体内 I 相代谢主要由 CYP3A4 控制,在体外肝微粒体实验中发现大黄素对肝微粒体细胞色素 P450 酶 CYP1A2,CYP2C9,CYP2D6 均有抑制作用,半数抑制浓度(IC_{50})分别为 $3.31, 2.60, 2.56 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,提示大黄素可能通过对多种细胞色素 P450 酶抑制而引起肝损伤。

HE 等^[26]研究发现大黄酸能诱导大鼠肝毒性,其毒理机制可能与调节肝微粒体细胞色素 CYP2C19 有关,此外大黄酸还能引起细胞线粒体功能发生障碍,破坏细胞的膜电位。

文海若等^[27]研究表明大黄素、芦荟大黄素和大黄酚处理正常人源肝细胞 HepaRG 后,能诱导 HepaRG 细胞内 ROS 显著增多;而芦荟大黄素和大黄酸可引起细胞内 Ca^{2+} 含量升高,此外,大黄素、芦荟大黄素、大黄酚和大黄酸还能诱导细胞线粒体损伤。

熊思敏等^[28]研究了大黄素对人肝癌 HepG2 细胞线粒体凋亡的影响,发现大黄素可抑制 HepG2 细胞生长且呈时间、浓度依赖性,随着大黄素浓度的升高,ROS 升高线粒体膜电位降低,从而导致 Ca^{2+} 外排含量升高,Caspase-3 活性增强诱导细胞凋亡。

总体而言,大黄中大黄素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚等蒽醌类成分和水解鞣质是大黄具有肝毒性的物质基础。而大黄导致肝毒性可能的毒理机制与升高 ALT, γ -GT,AST,TBIL,DBIL,TBA 水平,提高 TNF- α 表达,上调 P-gp,Nrp3 及下调 Ntcp 和 UGT1A1 mRNA 和蛋白表达水平,引起小鼠肝脏脂肪变性,诱导肝细胞纤维化、肝微粒体细胞色素 CYP3 A 和 CYP2C19,总细胞色素 P450 等酶活性,同时与白细胞介素介导的炎症反应及通过线粒体 Caspase 通路诱导 L02 细胞和 HepG2 细胞的细胞凋亡,激活内质网应激能力及钙离子通道等途径有关。

2 大黄的肾毒性及其毒理机制

2.1 对人肾小管上皮 HK-2 细胞的毒性研究 杨加培等^[29]在研究大黄酸对 HK-2 细胞的凋亡作用时发现,大黄酸可直接抑制 HK-2 细胞的增殖,增加 HK-2 细胞的凋亡,且与剂量,时间呈现依赖性。在研究大黄酸诱导 HK-2 细胞凋亡的机制时发现,大黄酸可提高氨基端激酶(c-Jun),激活转录因子-2(ATF-2),Caspase-3 mRNA 水平,上调 p-p38, p-JNK, Cleaved Caspase-3 蛋白。提示,大黄酸可能通过 MAPK 信号通路诱导人肾小管上皮 HK-2 细胞凋亡。

孙浩等^[30]发现大黄酸处理 HK-2 细胞后可上调乳酸脱氢酶(LDH)的释放,提高跨膜蛋白死亡因子(Fas),死亡因子受体(FasL),FADD 及 Caspase-3, Caspase-8 mRNA 表达水平,增加 Fas, FasL, 胞浆细胞色素 C(Cyt C)表达,下调 Caspase-8 原型表达,增加 Caspase-3, Caspase-8 裂解片段表达,从而抑制 HK-2 细胞活力,且浓度越高抑制能力越强。实验表明,大黄酸可能通过 Fas 途径诱导 HK-2 细胞凋亡。

任历等^[31]研究发现大黄总蒽醌会直接抑制 HK-2 细胞的增殖,且呈明显的量效关系,同时会改变细胞的形态。此外, HK-2 细胞周期的 S 期向 G₂/M 期的转化过程中,大黄总蒽醌类物质会对其产生抑制作用,引起细胞凋亡,特别是较低剂量的情况下,就能造成晚期凋亡或者坏死,推测此为大黄总蒽醌影响细胞增殖的机制之一,体现了大黄总蒽醌的细胞毒性。此外,任历团队还发现 12.5 ~ 200 mg·L⁻¹ 的大黄鞣质对 HK-2 细胞有轻微抑制作用,可影响 G₁ 细胞周期^[32]。

WANG 等^[33-34]研究表明,大黄素对 HK-2 细胞增殖具有时间和剂量依赖性抑制作用,阻滞 HK-2 细胞周期 G₁ 期,同时大黄素在造成 HK-2 细胞凋亡的浓度下,会提高 Caspase-3 的活性,而用 Caspase-3 特异性抑制剂(Ac-DEVD-CHO)可抑制此改变;大黄素在诱导 HK-2 细胞凋亡的同时使 Cathepsin-B 活性表达显著升高,当 Cathepsin-B 特异性抑制剂(CA-074)存在时,大黄素诱导的 Caspase-3 活性升高的情况会受到抑制,恢复 HK-2 的细胞活力。说明在体外,大黄素会通过 Caspase-3 依赖方式造成 HK-2 细胞的凋亡。

WANG 等^[35]研究发现大黄素可降低 HK-2 细胞活力, Caspase-3 的裂解和激活、线粒体膜电压及细胞色素 C 的分泌,同时能升高过氧化物酶体生物激活受体 γ (PPAR γ) 的基因和蛋白表达,推测其可能通过线粒体通路引起细胞的凋亡。

2.2 影响细胞信号转导通路引起的毒性研究

YAN 等^[36]观察到大黄总蒽醌导致的肾小管上皮细胞损伤和 MAPK 激酶与 CYP1A1 基因有关。而 MAPK 是多种生物效应的整合点,能够被多种细胞外信号激活,具有广泛的催化活性,激活后参与多种细胞生物效应;同时通过研究服用大黄总蒽醌后肾脏表达的差异基因发现可能 p38 MAPK 通路中的 MAPK 激酶 6 是造成细胞损伤的重要原因。

2.3 长期毒性研究 张陆勇等^[37]在对大黄总蒽醌的大鼠长期毒性实验中发现,高剂量的大黄总蒽醌灌胃后,大鼠精神不佳,体质量增长缓慢;红细胞计数和压积、血红蛋白水平和 Na⁺ 降低,而尿素氮, K⁺ 和 Ca²⁺, 尿 β_2 微球蛋白(β_2 -MG), 总蛋白质等升高;观察到肾脏的近曲小管上皮细胞都有肿胀和变性。表明大黄总蒽醌在大鼠体内的主要毒性靶器官为肾脏,尤其是肾近曲小管,此种毒性反应是可以逆转的。大黄总蒽醌类化合物是在大鼠中的安全使用剂量是 794 mg·kg⁻¹。

黄婉奕等^[38]研究了大黄素长期给药对小鼠肾脏毒性的影响发现,给药后小鼠体质量下降明显,肾脏系数降低,血尿素氮(BUN)和血肌酐(SCr)明显升高,超氧化物歧化酶(SOD)活力下降, TNF- α 升高明显,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性和谷胱甘肽/氧化性谷胱甘肽(GSH/GSSG)明显降低, Caspase-3 表达显著升高,此外伴有肾脏肾小管上皮细胞肿胀浑浊、肾小管管腔中发现蛋白管型、充血以及淋巴细胞灶性增生明显。推测其潜在毒性机制可能与诱发氧化应激损伤,触发炎症反应,进而使细胞凋亡有关。

李彦桥等^[39]研究了芦荟大黄素长期给药对小鼠肾脏毒性的影响发现,给药后小鼠血清中 BUN 和 SCr 含量升高,并伴随肾小管和肾小球轻中度损伤,此外,芦荟大黄素能升高小鼠血清丙二醛(MDA), TNF- α 和 IL-6 含量及 TGF- β_1 和 Caspase-3 蛋白表达水平,降低 SOD 活性, GSH-Px 含量和肾脏 GSH/GSSG,推测其机制可能与机体氧化应激、细胞凋亡、炎症反应和 TGF- β_1 蛋白表达有关。

胡樱凡等^[40]发现大黄酸长期灌胃小鼠后,小鼠 BUN, SCr, TNF- α 浓度显著升高, SOD 活性下降, Caspase-3 水平上调;此外,高剂量组 GSH-Px 含量以及 TGF- β_1 表达,肾脏组织充血严重病变,肾小管官腔发现蛋白管型,肾小管上皮细胞以及淋巴细胞肿胀增生。提示大黄酸的毒性机制可能与谷胱甘肽抗氧化系统有关,引起过度氧化以及炎症反应,诱使

细胞凋亡。

邓诺等^[41]研究发现 16 g·kg⁻¹的大黄能升高大鼠尿液中脂质运载蛋白 (NGAL) 水平,引起大鼠肾脏轻中度的病理损伤并伴有肾丛集素 (Clusterin) mRNA 表达下调,而 2 g·kg⁻¹的大黄会诱导肾脏有机阴离子转运体 1,3 (OAT1, OAT3) 以及其 mRNA 的表达水平升高。

张腾^[42]研究发现大黄水煎液对大鼠灌胃 60 d 后,大鼠精神萎靡,血清 BUN 浓度升高,尿液中 β_2 -MG 水平升高,肾脏中阻止细胞凋亡蛋白 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达水平降低,而促细胞凋亡蛋白 Bax mRNA 和蛋白表达水平升高,此外大鼠的肾脏近曲小管的上皮细胞发生了明显的肿胀变性,肾小管的管腔缩小,偶尔还会见由于上皮细胞脱落之后产生的细胞空洞,但上述损伤能可逆性恢复。

赵玲等^[43]研究发现,长期对大鼠进行生大黄和熟大黄总提物的灌胃,可使大黄的体内血清 BUN,肌酐 (Crea),半胱氨酸抑制素 (Cys-c) 和 β_2 -MG 升高,肾小球滤过率下降,从而存在一定的肾毒性。

2.4 其他 美国“国家毒理学规划”采用 F344/N 大鼠和 B6C3F1 小鼠对大黄中的大黄素进行了长期毒性及致癌性评价,实验结果说明,大黄素会升高大鼠肾小管透明小滴生成发生率,加重肾小管色素沉着,升高沉着发生率,进一步增加雌性小鼠肾病的发生概率^[44]。

雷荣辉等^[45]利用 1H-NMR 代谢组学技术研究大黄素的肾毒性机制发现,1 500 mg·kg⁻¹的大黄素给药 16 d 可引起大鼠 SCr 下降,并且使肾细胞胞浆呈现空泡化状态;降低大鼠血液中乳酸、糖、氨基酸和脂肪酸含量及乳酸和胆碱/磷酸卵磷脂水平,升高尿液中乳酸、糖和氨基酸水平及肾脏中醋酸盐和肌酐/肌酸。推测大黄肾毒性的机制涉及了脂肪和能量代谢紊乱。王青秀等^[46]认为大黄素会使脂类成分发生变化,损伤细胞的膜性结构,最终使肾小管上皮细胞受损从而导致重吸收发生障碍,但是损伤是轻微且可逆的。

雷湘等^[20]在大黄素的急毒实验中发现其可致使小鼠肾脏肾小球明显萎缩,管腔不干净,有管型。

综上所述,大黄具有肾毒性的物质基础可能是蒽醌类成分如大黄素、大黄酸和大黄素甲醚,且大黄肾毒性机制可能与升高 BUN, SCr, β_2 -MG, Cys-c, LDH, NAG 酶, NGAL 含量和活性,上调 OAT1, OAT3, B 淋巴瘤细胞瘤相关 X 蛋白 (Bax) mRNA 和 PAR γ 表达水平,抑制 HK-2 细胞增殖促进其凋亡,阻滞 HK-2 细胞周期,诱导肾小管透明小滴生成和肾小管色素沉着有关,同时可能也涉及线粒体膜电位途径凋亡机制 (Bax/Caspase 途径), p38 MAPK 通路中 MAPK 激酶和 CYP1A1 基因激活, UGT2B7 和 MRP2 的联合调节及机体氧化应激、细胞凋亡、炎症反应等途径。大黄肝、肾毒性机制现阶段的研究总结见图 1。

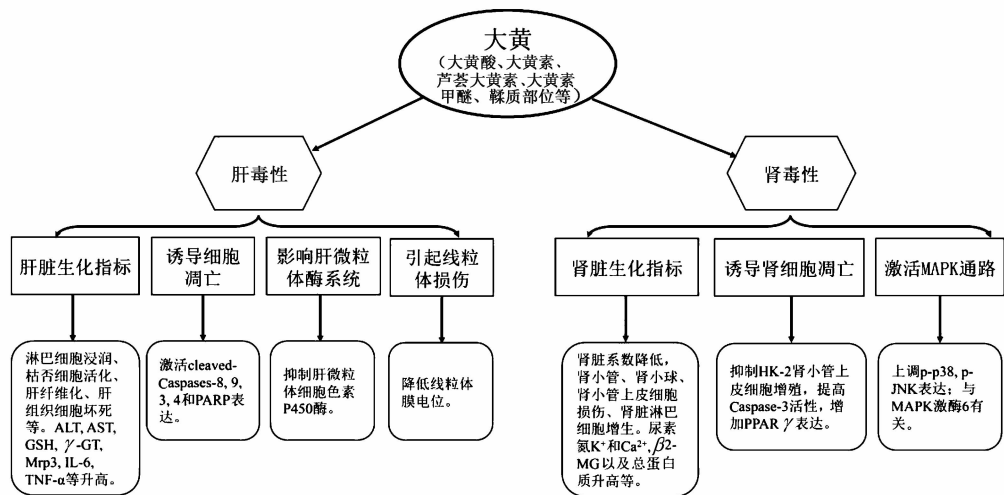


图 1 大黄肝、肾毒性机制研究现状

Fig.1 Research progress on hepatotoxicity and nephrotoxicity of Rhei Radix et Rhizoma

3 大黄毒性的控制方法研究现状

大黄在中医药系统中有着不可取代的作用。随着人民生活水平的提高,越来越注重生活质量。

大黄除了在医药方面的应用,在食用、养生、减肥等的优点也逐渐进入人们的视野。然而,往往忽略了大黄对肝脏、肾脏带来的损伤。事实上,古人有书

“大黄为厉,九泉应悔自知医”以告诫后人,应在医生的指导下服用大黄。合理安全地使用大黄,在药理学研究的背景下,还可综合考虑炮制和配伍,以期减毒。

3.1 炮制减毒 张仲景的《金匱玉函经》中最早提到了大黄的炮制方法:“皆去黑皮、或炮或生……”,经千年历史沉淀和发展,现已有 20 多种大黄的炮制方法,包括有熟大黄、酒大黄、大黄炭、醋大黄等。

王伽伯等^[47]在研究大黄减毒“量-毒”规律时发现不同炮制品的大黄都会根据剂量的增加越来越偏离空白组,且呈增大趋势,具有显著的“量-毒”关系,大黄剂量越大,其肝肾毒性越明显;在高剂量下,各炮制品与空白组的偏离距离由大到小排序依次为生大黄、醋大黄、酒大黄、熟大黄、大黄炭、清宁片。整体来看,大黄炮制品的毒性明显小于生品,且减毒强度与炮制程度密切相关。此外,王伽伯等^[48]在研究大黄化学成分与炮制减毒之间的相关性时,通过典型相关分析法分析了大黄的化学成分与肝肾功能的生化指标,结果表明与肝肾毒性相关的化学成分顺序为总结合蒽醌 > 总鞣质 > 总游离蒽醌;游离蒽醌中为芦荟大黄素 > 大黄素甲醚 > 大黄酸 > 大黄素 > 大黄酚;结合蒽醌顺序为结合芦荟大黄素 > 结合大黄素甲醚 > 结合大黄酚 > 结合大黄素 > 结合大黄酸。根据实验结果说明大黄经炮制可减少其肝肾毒性,这可能与炮制后的大黄的结合蒽醌和鞣质类成分降低有关,其中与毒性最相关的化合物为游离态和结合态的芦荟大黄素和大黄素甲醚。

姬春好^[49]通过研究发现生大黄的泻下功效峻烈,而制大黄的作用较为缓和,清热活血化瘀的同时产生的胃肠道不良反应会减弱。邢小燕^[50]报道了生大黄的总提取物为 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (相当于 2015 年版《中国药典》最大用量的 40 倍)是产生毒性反应的最小剂量,而经过炮制加工后成为熟大黄总提取物的最小毒性反应剂量为 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,说明经过炮制后,大黄的毒性作用大大的降低。

邹志远等^[51]发现清蒸和醋蒸能有效地降低大黄的遗传毒性,其减毒机制可能通过蒸制中产生的高温及含水缺氧等原因使结合型蒽醌类化合物中的苷键发生断裂,从而变成具有低毒性的游离型蒽醌类化合物及其衍生物^[52]。从工艺上看,清蒸的效果略微强于醋蒸,可能是因为酸性条件下部分蒽醌被还原成蒽酚及其蒽酮,氧化的过程相对延缓^[53]。

李会芳等^[54]考察大黄不同炮制品对四膜虫生

物热活性的影响,发现大黄不同炮制品对四膜虫生长有不同程度的抑制作用,其作用强度顺序为生大黄 > 酒大黄 > 熟大黄 > 大黄炭,减毒作用表现为降低对四膜虫生长的抑制率,缩短传代时间,降低最大热功率等。

张志等^[55]对比了生大黄与煨制后的大黄对正常大鼠胃肠道的影 响,发现与生大黄组相比,大黄 ($1.5, 3.0, 6.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 经煨制后可明显提高大鼠小肠推进能力,血清胃泌素 (GAS), 血浆胃动素 (MTL), IL-10, 降低胃系数, 胃内残留物, TNF- α 浓度, 从而减轻大黄“苦寒败胃”的作用。

3.2 配伍减毒 中医配伍用药的关键之一为增效减毒。不同药物之间的配伍是中医主要用药形式。古人擅将大黄与清热类、活血化瘀类、理气类和温里类等药物配伍治疗各种各样的疾病。

柴宝娟^[56]研究发现大黄在泻心汤中及与甘草、黄连配伍后蒽醌类成分含量均降低,且肝肾毒性亦有降低。大黄 + 甘草组和大黄 + 黄连组 ALT 均明显降低,泻心汤组较大黄组 ALT 显著降低,推测与配伍后蒽醌类成分含量降低有关。此外,大黄在泻心汤中及配伍黄连后对人胚肝细胞 L-O2 和 HK-2 细胞能减轻细胞膜的损伤及增强受损的线粒体功能。

赵琳琳等^[57]研究发现,大黄配伍姜黄可明显降低血脂。

4 结语

总之,随着大黄毒性研究的不断深入,如何减轻或消除大黄的不良反应,将会成为研究的焦点。针对大黄的肝肾毒性,既要从客观的角度进行分析,又要运用先进的方法与技术进行研究,通过大量的药理实验,结合流行病学,建立大黄以及其蒽醌类成分的中成药的安全性评价体系,规范技术和确定相应的标准;基于中医的辨证论治,深入研究大黄炮制和配伍等减毒方法的科学内涵和机制,为大黄的“毒性”提供更好的理论支撑,保证中药在有效的情况下又能安全的应用,保障临床的用药安全。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:23-24.
- [2] Lloyd J U. *Origin and History of All the Pharmacopoeial Vegetable Drugs, Chemicals and Preparations with Bibliography* [M]. Charleston: Nabu Press, 1921.
- [3] GUAN Q, LIANG S, WANG Z, et al. ¹H-NMR-based metabonomic analysis of the effect of optimized rhubarb

- aglycone on the plasma and urine metabolic fingerprints of focal cerebral ischemia-reperfusion rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 154(1): 65-75.
- [4] Caoy J, PU Z J, TANG Y P, et al. Advances in bioactive constituents, pharmacology and clinical applications of rhubarb [J]. *Chin Med*, 2017, 12(1):36.
- [5] MA L, ZHAO L, HU H, et al. Interaction of five anthraquinones from rhubarb with human organic anion transporter 1 (SLC22A6) and 3 (SLC22A8) and drug-drug interaction in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(3): 864-871.
- [6] ZHANG L, CHANG J, ZHANG B, et al. The pharmacokinetic study on the mechanism of toxicity attenuation of rhubarb total free anthraquinone oral colon-specific drug delivery system [J]. *Fitoterapia*, 2015, 104(15): 86-96.
- [7] 窦志华, 许波, 施忠, 等. 大黄蒽醌类成分肝肾毒性和效应物质研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(10): 1214-1217.
- [8] 程华尧. 正确认识“无毒”中药[N]. *中国中医药报*, 2017-11-27(004).
- [9] 由田. 过量大黄致肝细胞损伤的研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2005.
- [10] 韦美金, 黄娟, 白俊其, 等. 大黄素对大鼠血清肝功能、肝脏转运蛋白及代谢酶 UGT1A1 表达的影响[J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(7): 1551-1555.
- [11] WU L, HAN W, CHEN Y, et al. Gender differences in the hepatotoxicity and toxicokinetics of emodin: the Potential Mechanisms Mediated by UGT2B7 and MRP2 [J]. *Mol Pharm*, 2018, 15(9): 3931-3945.
- [12] WANG J, KONG W, WANG H, et al. Toxic effects caused by rhubarb (*Rheum palmatum* L.) are reversed on immature and aged rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134(2): 216-220.
- [13] WANG J, ZHAO H, ZHAO Y, et al. Hepatotoxicity or hepatoprotection? Pattern recognition for the paradoxical effect of the chinese herb *Rheum palmatum* L. in treating rat liver injury [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24498.
- [14] 王艳辉, 赵海平, 王伽伯, 等. 基于“有故无殒”思想的熟大黄对肝脏量-毒/效关系研究[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(15): 2918-2923.
- [15] Miele L, Forgiione A, La Torre G, et al. Serum levels of hyaluronic acid and tissue metalloproteinase inhibitor-1 combined with age predict the presence of nonalcoholic steatohepatitis in a pilot cohort of subjects with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Transl Res*, 2009, 154(4): 194-201.
- [16] 王建平. 大黄有毒物质基础的研究[J]. *中国民族民间医药*, 2011, 20(24): 63-64.
- [17] 覃鲁珊, 赵海平, 赵艳玲, 等. 大黄蒽醌与鞣质对大鼠肝脏的保护和损伤双向作用[J]. *中国中西医结合杂志*, 2014, 34(6): 698-703.
- [18] 全云云, 周忆梦, 刘美辰, 等. 斑马鱼模型筛选何首乌肝毒性物质基础[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(6): 52-57.
- [19] 汪祺, 戴忠, 张玉杰, 等. 基于 UGT1A1 酶介导的胆红素代谢考察大黄素在肝微粒体体系中的肝毒性[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(23): 4424-4427.
- [20] 雷湘, 陈刚, 陈科力, 等. 大黄素对小鼠的急性毒性研究[J]. *中药药理与临床*, 2008, 24(1): 29.
- [21] 刘德明, 周春燕, 吴嘉思, 等. 大黄素通过激活线粒体 Caspase-8 通路诱导 L02 细胞凋亡[J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(5): 23-26.
- [22] 刘德明, 周春燕, 吴嘉思, 等. 大黄素通过线粒体通路诱导 HepG2 细胞凋亡[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(3): 104-108.
- [23] KoraMagazi A, WANG D, Yousef B, et al. Rhein triggers apoptosis via induction of endoplasmic reticulum stress, Caspase-4 and intracellular calcium in primary human hepatic HL-7702 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 473(1): 230-236.
- [24] 卫培峰, 吴艳艳, 焦晨莉. 制何首乌及大黄酚对小鼠肝细胞凋亡的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(14): 172-173.
- [25] 王来友, 李镜清, 陈涛, 等. 大黄素的 I 相代谢途径及其对细胞色素 P450 酶的抑制作用[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2014, 19(3): 241-245.
- [26] HE L N, YANG A H, CUI T Y, et al. Reactive metabolite activation by CYP2C19-mediated rhein hepatotoxicity [J]. *Xenobiotica*, 2014, 45(4): 361-372.
- [27] 文海若, 毛志慧, 耿兴超, 等. 人源 HepaRG 肝细胞毒性与遗传毒性高通量筛选方法的初步建立[J]. *药物评价研究*, 2017, 40(11): 1550-1558.
- [28] 熊思敏, 张金晓, 康玮, 等. 大黄素诱导人肝癌 HepG2 细胞线粒体凋亡作用研究[J]. *药物评价研究*, 2018, 41(5): 773-779.
- [29] 杨加培, 孙浩, 王丹丹, 等. 大黄酸通过 MAPK 信号转导通路诱导 HK-2 细胞凋亡[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(15): 147-151.
- [30] 孙浩, 杨加培, 毛勇, 等. Fas 途径参与大黄酸诱导 HK-2 细胞凋亡[J]. *中国药科大学学报*, 2015, 46(4): 469-475.
- [31] 任历, 曾滨阳, 张诗缙, 等. 大黄总蒽醌对人肾小管上皮细胞毒性作用及相关机制研究[J]. *中药药理与*

- 临床, 2015, 31(1): 79-83.
- [32] 任历, 杨伟, 张诗缙, 等. 大黄鞣质对人肾小管上皮细胞毒性作用及量-毒关系研究[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(4): 132-135.
- [33] WANG C, WU X, CHEN M, et al. Emodin induces apoptosis through Caspase 3-dependent pathway in HK-2 cells[J]. Toxicology, 2007, 231(2/3): 120-128.
- [34] WANG C, JIANG Z, YAO J, et al. Participation of cathepsin B in emodin-induced apoptosis in HK-2 cells [J]. Toxicol Lett, 2008, 181(3): 196-204.
- [35] WANG C, DAI X, LIU H, et al. Involvement of PPAR γ in emodin-induced HK-2 cell apoptosis [J]. Toxicol in Vitro, 2015, 29(1): 228-233.
- [36] YAN M, ZHANG L Y, SUN L X, et al. Nephrotoxicity study of total rhubarb anthraquinones on sprague dawley rats using DNA microarrays [J]. J Ethnopharmacol, 2006, 107(2): 308-311.
- [37] 张陆勇, 江振洲, 濮存海, 等. 大黄总蒽醌对 SD 大鼠灌胃给药的长期毒性研究[J]. 中国生化药物杂志, 2004, 24(4): 206-209.
- [38] 黄婉奕, 李彦桥, 蒋晴, 等. 大黄素对小鼠肾脏毒性表现的凋亡机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20182421.
- [39] 李彦桥, 黄婉奕, 梁雨生, 等. 芦荟大黄素对小鼠肾毒性的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20190424.
- [40] 胡樱凡, 黄婉奕, 李彦桥, 等. 大黄酸对小鼠肾脏的毒性机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, doi: org/10.13422/j.cnki.syfjx.20190821.
- [41] 邓诺, 易艳, 梁爱华, 等. 大黄肾脏毒性部分机制研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(13): 2777-2783.
- [42] 张腾. 大黄对大鼠肾脏损害作用及其可逆性研究[D]. 唐山: 华北理工大学, 2016.
- [43] 赵玲, 胡昌江, 潘新, 等. 长期服用生大黄、熟大黄对大鼠肝功能影响的比较[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(15): 1384-1387.
- [44] Boudreau M D, Beland F A, Nichols J A, et al. Toxicology and carcinogenesis studies of a nondecolorized whole leaf extract of Aloe barbadensis Miller (Aloe vera) in F344/N rats and B6C3F1 mice [J]. Natl Toxicol Program Tech Rep Ser, 2013, 577: 1-266.
- [45] 雷荣辉, 王青秀, 颜贤忠, 等. 利用 $^1\text{H-NMR}$ 技术研究大黄素染毒后大鼠内源性代谢物的改变[J]. 药物评价研究, 2015, 38(1): 29-35.
- [46] 王青秀, 吴纯启, 杨红莲, 等. 大黄中游离蒽醌对 HK-2 细胞系的毒性作用研究[J]. 中国新药杂志, 2007(3): 189-192, 199.
- [47] 王伽伯, 马永刚, 金城, 等. 对应分析在大黄炮制减毒“量-毒”规律研究中的应用[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(19): 2498-2502.
- [48] 王伽伯, 马永刚, 张萍, 等. 炮制对大黄化学成分和肝肾毒性的影响及其典型相关分析[J]. 药学学报, 2009, 44(8): 885-890.
- [49] 姬春好. 大黄炮制及临床应用[J]. 甘肃中医学院学报, 2008(1): 41-43.
- [50] 邢小燕. 基于肝损伤动物模型的大黄毒性观测与合理制用研究[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2007.
- [51] 邹志远, 宋有涛, 杨雷, 等. 不同炮制方法对大黄的遗传毒性的减毒效果的研究[J]. 辽宁大学学报: 自然科学版, 2011, 38(4): 338-342.
- [52] 王宾豪, 杨荣平, 张小梅, 等. 高效液相色谱法测定决明子不同清炒品中 5 种蒽醌类成分的含量[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(4): 853-854.
- [53] 陈涵. 蒽醌类中药质量控制研究进展[J]. 临床荟萃, 2010, 25(22): 2018-2020.
- [54] 李会芳, 马永刚, 肖小河, 等. 基于四膜虫生物热活性的大黄炮制减毒研究[J]. 中草药, 2012, 43(1): 103-105.
- [55] 张志, 李听弦, 徐柳, 等. 大黄煨制前后对正常大鼠胃肠功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20190314.
- [56] 柴宝娟. 大黄配伍减毒物质基础及机理研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2012.
- [57] 赵琳琳, 李盖, 王会还, 等. 大黄与姜黄不同配比降低血脂大鼠模型疗效研究[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2013, 16(6): 978-980.

[责任编辑 张丰丰]