

芦荟大黄素对小鼠肾毒性的作用机制

李彦桥, 黄婉奕, 梁雨生, 罗煜, 蒋晴, 曾勇, 王平, 孟宪丽*
(成都中医药大学, 成都 611137)

[摘要] **目的:**研究长期给予不同剂量的芦荟大黄素导致小鼠肾毒性,并探讨其毒性机制。**方法:**将 30 只昆明种小鼠随机分为雌雄空白组、雌雄芦荟大黄素低、高剂量组(0.8, 1.6 g·kg⁻¹)。芦荟大黄素各剂量组连续灌胃给药 11 周,每日早晚各 1 次。采用生化试剂盒检测小鼠血清尿素氮(urea nitrogen, BUN),肌酐(creatinine, SCr),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,肾脏总谷胱甘肽(total glutathione, T-GSH)/氧化性谷胱甘肽试剂盒(oxidized glutathione, GSSG)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)水平;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)和白细胞介素-6(interleukins-6, IL-6)水平;苏木素-伊红(HE)染色检测肾脏病理变化;免疫组化检测肾脏半胱氨酸蛋白酶-3(cysteine aspartic acid specific protease-3, Caspase-3)和转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)蛋白表达。**结果:**与同性别空白组比较,芦荟大黄素高剂量组雌、雄小鼠血清中 BUN 含量升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),芦荟大黄素高剂量组雌性小鼠血清中 SCr 含量升高($P < 0.05$),芦荟大黄素低剂量组肾小管轻度损伤,高剂量肾小管和肾小球中度损伤;与空白组比较,芦荟大黄素高剂量组雌、雄小鼠血清 MDA 含量升高($P < 0.05$),SOD 活性降低($P < 0.05$),芦荟大黄素高剂量组雌雄小鼠肾脏中 GSH/GSSG 含量降低($P < 0.05$),雄性小鼠 Caspase-3 蛋白表达增加($P < 0.05$);与空白组比较,芦荟大黄素高剂量组雌性小鼠 TNF- α 和 IL-6 含量升高($P < 0.05$),芦荟大黄素低、高剂量组雌雄小鼠肾脏 TGF- β_1 蛋白表达均增加($P < 0.05$)。**结论:**芦荟大黄素 1.6 g·kg⁻¹ 给药 11 周,对小鼠肾脏有毒性作用,其机制与机体氧化应激、细胞凋亡和 TGF- β_1 蛋白表达有关。

[关键词] 芦荟大黄素;肾毒性;氧化应激;凋亡;转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)11-0048-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190424

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181101.1208.005.html>

[网络出版时间] 2018-11-05 13:52

Mechanism of Nephrotoxicity of Aloe Emodin in Mice

LI Yan-qiao, HUANG Wan-yi, LIANG Yu-sheng, LUO Yu, JIANG Qing, ZENG Yong,
WANG Ping, MENG Xian-li*

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To study nephrotoxicity induced by long-term administration of different doses of aloe-emodin in mice, and explore its mechanism. **Method:** A total of 30 male and female Kunming mice were randomly divided into normal control group, and low-dose aloe-emodin group, high-dose aloe-emodin group (0.8, 1.6 g·kg⁻¹). Every dose of group was administered intragastrically for 11 weeks, twice daily. effect of serum urea nitrogen (BUN), creatinine (SCr), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), Glutathione (GSH/GSSG) and Glutathione Peroxidase (GSH-Px) levels were detected by biochemical kits according to manufacturer's instruction. Enzyme-linked immune assay was used to determine serum tumor necrosis factor (TNF) - α and interleukins (IL) -6 levels. Hematoxylin eosin(HE) staining was used to detect renal pathological

[收稿日期] 20180806(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473419)

[第一作者] 李彦桥,在读硕士,从事中药药理与毒理研究,E-mail:614756744@qq.com

[通信作者] *孟宪丽,教授,从事中药药理与毒理研究,E-mail:xlm999@cdutcm.edu.cn

changes in kidney tissues, and cysteine aspartic acid specific protease (Caspase) -3 and transforming growth factor (TGF) β_1 proteins were determined by immunohistochemistry. **Result:** According to results, compared with normal control group, the levels of BUN and SCr in serum with high-dose aloe-emodin were increased. The renal tubules in low-dose group were mildly injured, while renal tubules and glomeruli of high-dose group were moderately damaged. Compared with normal control group, the level of SOD was significant decreased ($P < 0.05$), MDA was increased ($P < 0.05$), the levels of GSH/GSSG in kidneys of high-dose groups were decreased ($P < 0.05$). In high-dose group, the expression of Caspase-3 protein was increased in kidneys, especially in males ($P < 0.05$). Compared with normal control group, the levels of TNF- α and IL-6 were increased, the expression of TGF- β_1 protein in kidneys was increased in low-dose and high-dose groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** results show that $1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ aloe-emodin was administered intragastrically for 11 weeks, which had toxic effects on kidney in mice. The mechanism may be related to oxidative stress, apoptosis and TGF- β_1 protein expression.

[**Key words**] aloe-emodin; nephrotoxicity; oxidative stress; apoptosis; transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1)

芦荟大黄素是大黄、何首乌和决明子中天然存在的一种蒽醌类物质,具有抗炎、抗病毒和抗肿瘤等药理作用^[1-2]。但有研究报道含蒽醌类的中药具有肝肾毒性作用^[3]。王建平^[4]对小鼠灌胃大黄各部位提取物 7 d 后,发现游离蒽醌组对小鼠的主要毒性器官为肾脏。以 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 大黄给大鼠灌胃 6 个月,大鼠肾小管上皮细胞显示损伤^[5]。王伽伯等^[6]通过亚急性毒性实验比较不同炮制品的大黄对肝肾毒性差异研究中发现,对肝肾毒性最大的游离蒽醌是芦荟大黄素。导致肾毒性的含蒽醌类的中药主要是大黄,且毒性与给药剂量和时间有关。大黄蒽醌作用于正常成年男性肾近端小管上皮细胞 HK-2 时,当药物在 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下,抑制 HK-2 细胞增殖作用较弱,在 $30 \sim 60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时抑制细胞增殖作用增加明显,并出现晚期的凋亡/坏死^[7]。美国毒理学规划研究显示,大鼠灌胃大黄蒽醌 $135 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 14 周以上,出现肾小管损伤^[8]。关于芦荟大黄素的肾毒性作用机制并不清楚,目前已明确大黄蒽醌对肾脏毒性的机制与细胞凋亡^[9],及增加转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 蛋白表达有密切的关系^[10-11]。因此,本研究通过长期给予昆明种小鼠不同剂量的芦荟大黄素,研究芦荟大黄素的肾毒性机制是否与诱导氧化应激、细胞凋亡和增强 TGF- β_1 蛋白表达有关。

1 材料

1.1 药物及试剂 芦荟大黄素(宝鸡市辰光生物科技有限公司,批号 20161109,纯度 $\geq 98\%$);尿素氮(BUN),血肌酐试剂盒(SCr),丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD),总谷胱甘肽(T-GSH)/氧化性谷胱甘肽(GSSG),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)

测定试剂盒(南京建成生物有限公司,批号分别为 20170714, 20170830, 20170712, 20170713, 20170710,20170710);BCA 蛋白试剂盒,RIPA 裂解液,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(联科生物技术有限公司,批号分别为 72191291, 71725031, 228270724,220670752);苏木素,伊红(美国 Thermo 公司,批号分别为 20170308,20170308);蛋白酶抑制剂(瑞士 Rochce 公司,批号 24348600);半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3)一抗(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号 9662S);转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)一抗(美国 Abcam 公司,批号 92486);免疫组织化学 SP 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 18149A01)。

1.2 仪器 Varioskan Flash 型全波长扫描式多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司);CX22 型光学显微镜(日本 Olympus 公司)。DM1000L 徕卡显微成像系统(德国 Leica 公司)。

1.3 动物 健康昆明种小鼠 30 只,雌雄各半,18 ~ 22 g,由四川省人民医院实验动物研究所提供,合格证号 SCXK(川)2013-0015。本研究获得成都中医药大学实验动物委员会批准(批准号 TCM-2016-312)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 将 30 只健康小鼠适应性饲养 3 d 后,按照体质量和性别随机分为,雌性空白组、雄性空白组、雌性芦荟大黄素低剂量组、雄性芦荟大黄素低剂量组、雌性芦荟大黄素高剂量组、雄性芦荟大黄素高剂量组,每组 5 只。芦荟大黄素低、高剂量组分别按 $0.8, 1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ [混悬于 0.5% 羧甲

基纤维素钠(CMC-Na)中]灌胃,剂量根据本课题组前期芦荟大黄素急性毒性实验计算得出。空白组给予等体积的 0.5% CMC-Na 溶液。每天 2 次,持续给药 11 周。观察体质量、饮食摄水量、尿液、粪便、活动和死亡等状况。

2.2 小鼠肾脏指数计算 末次给药 12 h 后,小鼠脱颈椎处死,取肾脏,用生理盐水冲洗滤纸吸干残留水分,称重,计算肾脏(mg)/体质量(g)。

2.3 小鼠血清中 BUN, SCr, SOD, MDA, TNF- α 和 IL-6 水平测定 小鼠眼睛静脉丛取血,静置 10 ~ 20 min, 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清, 化学法检测血清中 BUN, SCr, SOD, MDA 含量, ELISA 检测血清中 TNF- α 和 IL-6 含量, 具体操作按照试剂盒说明书进行。

2.4 肾脏中 GSH/GSSG, GSH-Px 含量测定 取小鼠左肾下半部, 称重, 加入 cocktail 蛋白酶抑制剂和裂解液, 机械匀浆, 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, BCA 法测定蛋白浓度和 GSH/GSSG, GSH-Px 含量。具体操作按照试剂盒说明书进行。

2.5 小鼠肾脏组织病理学检查及评分标准 取小鼠左肾上半部, 用生理盐水冲洗后滤纸吸干, 经多聚甲醛固定, 常规包埋, 切片后, 苏木素染色 30 min, 流水洗涤, 盐酸-乙醇分化, 伊红染色 5 min, 最后梯度乙醇脱水, 封片, 在显微镜下观察组织病理学变化。

病理评分标准^[3,12], 将肾脏病变程度分为 4 个等级, 0~3 分表示从轻至重。肾组织结构正常, 记为 0 分; 轻度异常(肾小管上皮细胞颗粒变性或肾小球和肾间质毛细血管轻度充血), 记为 1 分; 中度损伤(肾小管上皮细胞水泡变性、肾小球和肾间质毛细血管中度充血或多区域淋巴细胞小灶性浸润), 记为 2 分; 重度损伤(肾小管上皮细胞重度肿胀、气球样变、多量淋巴细胞弥性浸润), 记为 3 分。

2.6 免疫组化检测肾脏 Caspase-3 和 TGF- β_1 蛋白表达 取小鼠右肾, 经多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, 不同浓度梯度乙醇逐级脱水, 抗原修复, 一抗(1:200)孵育, DAB 显色, 封片。阳性表达颜色为黄棕色。最后用 Image Pro Plus 软件进行半定量分析, 测定 Caspase-3 阳性表达数和 TGF- β_1 的积分吸光度 IA。每张切片在 200 倍光学显微镜下, 选取连续 3 个视野测定所得的平均值。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况观察及小鼠肾脏指数 空白组小鼠活动正常、毛色光亮、饮食摄水正常、粪便正常。与空白组比较, 芦荟大黄素低剂量组少量小鼠出现倦怠, 尿液和粪便呈红棕色, 高剂量组小鼠出现倦怠, 毛色稀疏, 尿液和粪便呈棕红色, 小鼠体质量下降, 饮食摄水有所减少。与空白组比较, 芦荟大黄素低、高剂量组雄性小鼠的肾脏指数降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 芦荟大黄素对小鼠肾脏指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of aloe emodin on kidney indexes in mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

性别	组别	剂量/mg·kg ⁻¹	肾脏指数/kg·g ⁻¹
雌性	空白	-	10.39 ± 0.61
	芦荟大黄素	0.8	10.33 ± 0.95
		1.6	10.27 ± 0.56
雄性	空白	-	13.36 ± 0.64
	芦荟大黄素	0.8	10.74 ± 1.57 ¹⁾
		1.6	9.37 ± 1.03 ²⁾

注: 与同性别空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2~6 同)。

3.2 芦荟大黄素对小鼠血清中 BUN 和 SCr 的影响 与空白组比较, 芦荟大黄素高剂量雌雄小鼠 BUN 含量升高($P < 0.01$)。与空白组比较, 芦荟大黄素低、高剂量组雄性小鼠 SCr 含量均升高($P < 0.05$)。见表 2。

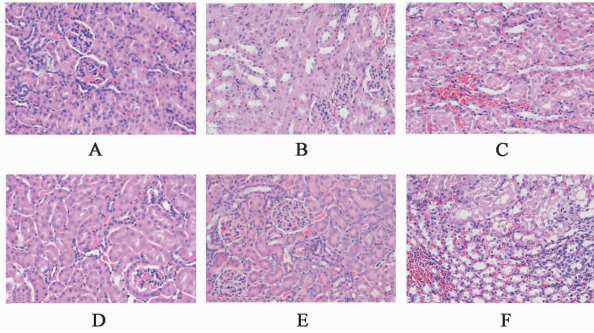
表 2 芦荟大黄素对小鼠血清中 BUN 和 SCr 的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of aloe emodin on BUN and SCr in mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

性别	组别	剂量/mg·kg ⁻¹	BUN /mmol·L ⁻¹	SCr / μ mol·L ⁻¹
雌性	空白	-	23.88 ± 3.67	50.94 ± 6.97
	芦荟大黄素	0.8	27.78 ± 4.61	65.78 ± 7.54
		1.6	31.45 ± 0.78 ²⁾	74.03 ± 10.73
雄性	空白	-	24.53 ± 1.88	53.13 ± 5.72
	芦荟大黄素	0.8	26.75 ± 3.54	64.28 ± 5.25 ¹⁾
		1.6	29.87 ± 3.49 ¹⁾	67.97 ± 6.21 ¹⁾

3.3 芦荟大黄素对小鼠肾脏组织病变变化的影响 空白组肉眼可见肾脏色泽红润, 质地柔软, 光镜下观察肾小管和肾小球结构正常。与空白组比较, 芦荟大黄素低剂量组雌、雄小鼠肾小管上皮细胞出现颗粒变性和轻度水泡变性, 肾小球未见明显病变, 病理评分为轻度损伤, 其中雄性小鼠肾脏损伤较严重($P < 0.05$)。芦荟大黄素高

剂量组雌、雄小鼠肾脏肾小管上皮细胞重度肿胀、肾小球和肾间质毛细血管充血,病理评分为中度损伤 ($P < 0.05$),个别雄性小鼠为重度损伤。见图 1,表 3。



A. 雌性空白组;B. 雌性芦荟大黄素低剂量组;C. 雌性芦荟大黄素高剂量组;D. 雄性空白组;E. 雄性芦荟大黄素低剂量组;F. 雄性芦荟大黄素高剂量组(图 2 同)

图 1 芦荟大黄素对小鼠肾脏病理形态的影响(HE, $\times 200$)
Fig. 1 Effect of aloesin on kidney pathomorphology in mice (HE, $\times 200$)

表 4 芦荟大黄素对小鼠氧化应激指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of aloesin on oxidative stress in mice($\bar{x} \pm s, n = 5$)

性别	组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	MDA/ $\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$	GSH/GSSG	GSH-Px/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$
雌性	空白	-	15.61 \pm 0.41	6.46 \pm 1.37	0.23 \pm 0.03	34.60 \pm 0.75
	芦荟大黄素	0.8	12.57 \pm 1.00 ¹⁾	8.69 \pm 1.05	0.19 \pm 0.07	33.46 \pm 3.92
		1.6	12.49 \pm 2.74	8.75 \pm 0.19 ¹⁾	0.17 \pm 0.04 ¹⁾	30.05 \pm 2.75
雄性	空白	-	15.44 \pm 0.77	6.77 \pm 1.33	0.21 \pm 0.05	34.52 \pm 2.52
	芦荟大黄素	0.8	13.55 \pm 1.62	9.70 \pm 2.38	0.20 \pm 0.06	30.90 \pm 3.96
		1.6	13.03 \pm 1.56 ¹⁾	10.29 \pm 0.81 ²⁾	0.14 \pm 0.03 ¹⁾	27.69 \pm 2.68 ²⁾

3.5 芦荟大黄素对小鼠炎症因子的影响 与空白组比较,芦荟大黄素高剂量雄性小鼠的 TNF- α , IL-6 含量升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 5。

表 5 芦荟大黄素对小鼠炎症因子的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 5 Effect of aloesin on inflammatory factors in mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

性别	组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	TNF- α	IL-6
雌性	空白	-	123.12 \pm 2.00	63.84 \pm 5.39
	芦荟大黄素	0.8	124.28 \pm 4.75	85.52 \pm 19.54
		1.6	125.14 \pm 4.53	97.85 \pm 35.78
雄性	空白	-	118.29 \pm 1.84	64.54 \pm 9.98
	芦荟大黄素	0.8	122.61 \pm 4.76	82.40 \pm 25.19
		1.6	125.63 \pm 3.00 ²⁾	111.67 \pm 28.77 ¹⁾

表 3 芦荟大黄素对肾脏组织病变化的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of aloesin on kidney morphology in mice($\bar{x} \pm s, n = 5$)

性别	组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	肾脏组织评分/分
雌性	空白	-	0.25 \pm 0.50
	芦荟大黄素	0.8	1.00 \pm 0.82
		1.6	1.25 \pm 0.50 ¹⁾
雄性	空白	-	0.25 \pm 0.50
	芦荟大黄素	0.8	1.25 \pm 0.50 ¹⁾
		1.6	1.75 \pm 0.96 ¹⁾

3.4 芦荟大黄素对小鼠氧化应激指标的影响 与空白组比较,芦荟大黄素低剂量组雌小鼠 SOD 活性均降低 ($P < 0.05$);芦荟大黄素高剂量组雄小鼠 SOD 活性均降低 ($P < 0.05$);芦荟大黄素高剂量组雌、雄小鼠 MDA 含量升高 ($P < 0.05, P < 0.01$);芦荟大黄素高剂量组雌、雄小鼠 GSH/GSSG 均降低 ($P < 0.05$);芦荟大黄素高剂量雄性小鼠 GSH-Px 含量降低 ($P < 0.05$)。见表 4。

3.6 芦荟大黄素对小鼠肾脏 Caspase-3 和 TGF- β_1 蛋白表达 Caspase-3 蛋白主要在肾小球、肾小管及间质处。与空白组比较,芦荟大黄素高剂量组雌性小鼠 Caspase-3 蛋白表达增高 ($P < 0.05$)。TGF- β_1 蛋白主要在肾小球、肾小管及间质处。与空白组比较,芦荟大黄素低、高剂量组雌雄小鼠 TGF- β_1 蛋白表达量均增加 ($P < 0.05$)。见图 2,表 6。

4 讨论

大黄已经广泛用于重症以及肾病的治疗^[13],但医学研究表明大黄有潜在的毒性。含蒽醌类药物的成分在体内以尿液排泄为主^[14],长期大量摄入具有潜在的肾毒性。王青秀^[5]通过体内外实验发现大黄提取物对大鼠肾毒性的物质主要是芦荟大黄素、大黄素和大黄酸。王建平^[4]发现大黄游离蒽醌对小鼠肾毒性作用更强。导致肾毒性的原因与给药时

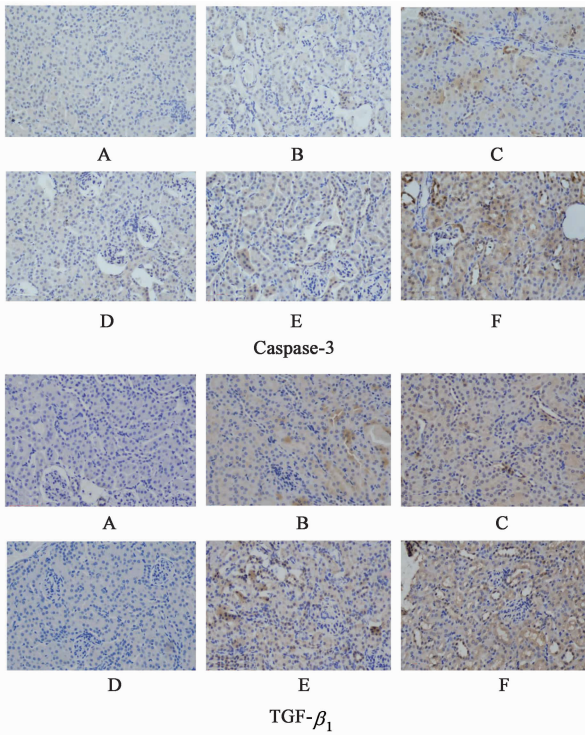


图 2 芦荟大黄素对小鼠肾脏 Caspase-3 和 TGF-β₁ 蛋白表达的影响 (IHC, ×200)

Fig. 2 Effect of aloemodin on expression of Caspase-3 and TGF-β₁ proteins in mouse kidney (IHC, ×200)

表 6 芦荟大黄素对小鼠肾脏 Caspase-3 和 TGF-β₁ 蛋白表达 IA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 6 Effect of aloemodin on expressions of Caspase-3 and TGF-β₁ proteins in mouse kidney ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

性别	组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	Caspase-3	TGF-β ₁
雌性	空白	-	19.75 ± 7.84	0.10 ± 0.02
	芦荟大黄素	0.8	26.67 ± 13.74	0.15 ± 0.03 ¹⁾
		1.6	28.00 ± 17.91	0.16 ± 0.03 ¹⁾
雄性	空白	-	24.58 ± 7.40	0.10 ± 0.02
	芦荟大黄素	0.8	26.87 ± 18.52	0.16 ± 0.03 ¹⁾
		1.6	50.20 ± 20.54 ¹⁾	0.17 ± 0.03 ¹⁾

间和剂量有关,以 18 g·kg⁻¹ 大黄总提取物给大鼠灌胃至第 30 天后,才发现肾脏出现水肿和核固缩^[15]。也有研究表明,大黄总蒽醌 60 mg·L⁻¹ 作用 HK-2 细胞 48 h,细胞凋亡率 > 50%^[7]。大黄素 80 μmol·L⁻¹ 时,抑制 HK-2 细胞增殖,促使细胞凋亡,线粒体膜电位降低^[16]。

芦荟大黄素作为蒽醌类成分中含量较高之一,其抗肿瘤、抗炎、泻下等治疗作用已有相关报道。但缺乏关于其肾毒性相关报道,其肾毒性机制并不完

全清楚。本研究中,0.8, 1.6 g·kg⁻¹ 芦荟大黄素对小鼠灌胃给药 11 周后,芦荟大黄素高剂量组雌、雄小鼠血清中 BUN, SCr 含量均显著升高,芦荟大黄素低剂量组小鼠肾脏轻度损伤,芦荟大黄素高剂量组肾脏中度损伤,个别雄性动物损伤相对严重。结果表明,芦荟大黄素高剂量对小鼠肾脏有毒性作用,且雄性动物损伤相对严重。

GSH/GSSG 是衡量细胞内稳态的重要指标, GSH 保护细胞免受氧化损伤,还可以协助 GSH-Px 清除自由基^[17-18]。细胞受到有害刺激后,活性氧大量产生,体内氧化系统和抗氧化系统紊乱,线粒体功能受到破坏,激活线粒体下游蛋白 Caspase-3 的表达,从而诱导细胞凋亡^[19]。大黄素通过 Caspase-3 通路导致 HK-2 细胞凋亡^[20]。Panigrahi 等^[21] 通过分子对接等方法,发现决明子中蒽醌类物质可造成 DNA 损伤并诱导细胞凋亡,还可使体内游离的 GSH 减少。本研究以 1.6 g·kg⁻¹ 芦荟大黄素作用小鼠,小鼠 GSH/GSSG 失衡, SOD 活性降低,清除超氧化物能力下降, MDA 含量升高,线粒体氧化功能受损,诱导 Caspase-3 蛋白表达,从而导致肾脏细胞凋亡。

体内抗氧化系统紊乱时,机体通过免疫调节分泌大量的 TNF-α 和 IL-6 等炎症因子。TNF-α 和 IL-6 等又能诱导肾小球产生活性氧和自由基,大量的 TNF-α 能激活巨噬细胞分泌炎症因子,进而引起局部炎症反应,使机体多器官受损^[22-23]。在肾病中, TGF-β₁ 是促进基质沉积和组织硬化的关键因素^[24], 会加速肾小球及肾小管间质纤维化^[25]。TGF-β₁ 一方面会抑制 TNF-α 和 IL-6 等炎症因子的合成,另一方面过度表达时又能促进炎症反应,导致肾脏纤维化^[26]。本研究以 1.6 g·kg⁻¹ 芦荟大黄素对小鼠灌胃给药 11 周, GSH-Px 含量降低,体内活性氧和自由基增多,抗氧化系统紊乱, TNF-α, IL-6 细胞因子分泌增多, TGF-β₁ 蛋白过度表达。阿霉素可用于建立肾病模型,陈红梅等^[27] 用免疫组化检测阿霉素建立大鼠肾病模型中 TGF-β₁ 蛋白表达增强。这与上述研究结果相符合。

通过上述实验结果分析,芦荟大黄素长期、大剂量口服对小鼠具有肾毒性。其机制与氧化应激、细胞凋亡及 TGF-β₁ 蛋白表达有关。本研究首次探讨了芦荟大黄素对小鼠的肾毒性及其机制,尚不确定体外肾毒性的机制。为了更加明确芦荟大黄素的肾毒性机制,确保用药安全,还应进行体外实验研究。

[参考文献]

- [1] 李牧,杜智敏.芦荟大黄素的药理作用研究进展[J].中国临床药理学杂志,2015,31(9):765-768.
- [2] CHEN R, ZHANG J, HU Y, et al. Potential antineoplastic effects of Aloe-emodin: a comprehensive review[J]. Am J Chin Med,2014,42(2):275-288.
- [3] 陶明宝,张乐,刘飞,等.含蒽醌类成分中药的安全性研究进展[J].中药药理与临床,2016,32(6):238-243.
- [4] 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.
- [5] 王青秀.大黄及其主要成份的毒性毒理研究[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院,2007.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Program N T. NTP toxicology and carcinogenesis studies of EMODIN (CAS NO. 518-82-1) feed studies in F344/N rats and B6C3F1 mice [J]. Natl Toxicol Program Tech Rep Ser,2001,493(6):1-278.
- [9] 笪红远,江振洲,王翠芬,等.大黄酸和大黄素在体外对人肾小管上皮细胞的毒性作用研究[J].中草药,2009,40(1):102-105.
- [10] 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.
- [11] 毕礼明,陈英兰,陆曙,等.大黄治疗肾脏病安全性探析[J].医学争鸣,2016,7(6):29-32,36.
- [12] 李一飞,徐婷婷,姚广涛,等.尿液 NGAL, KIM-1, IL-18 在商陆所致的大鼠肾损伤中的变化特征及其联合检测的意义[J].中国中药杂志,2012,37(23):3611-3617.
- [13] 赵平.大黄附子不同配伍比例灌肠治疗慢性肾衰竭[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(15):302-304.
- [14] 高峰,刘承萍,曹骋,等.大鼠体内大承气汤蒽醌成分的药代动力学研究[J].中华中医药杂志,2011,26(5):1018-1021.
- [15] 柴宝娟,李祥,陈建伟.大黄配伍前后对大鼠肝肾的影响[J].中药药理与临床,2012,28(3):66-69.
- [16] 王青秀,吴纯启,周莉,等.大黄素诱导 HK-2 细胞凋亡的机制探讨[J].中国新药杂志,2010,19(22):2034-2038,2044.
- [17] 黄伟,孙蓉.益母草肾毒性与氧化损伤机制的相关性研究[J].中药药理与临床,2010,26(2):54-56.
- [18] 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.
- [19] 张晓田,宋天保. Caspase-3 与细胞凋亡的研究[J].医学综述,2002,8(11):621-623.
- [20] 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.
- [21] Panigrahi G K, Verma N, Singh N, et al. Interaction of anthraquinones of *Cassia occidentalis* seeds with DNA and Glutathione[J]. Toxicol Rep,2018,5:164-172.
- [22] 郑媛,王淳,李伟,等.复方痛风康对高尿酸血症模型大鼠肾功能的保护作用及影响 IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β_1 的研究[J].中国中西医结合肾病杂志,2015,16(7):575-578,659.
- [23] 阮雄中.“脂质肾毒性学说”的最新研究进展[J].中国科学:生命科学,2018,48(1):47-55.
- [24] XIAO Z, LI C W, SHAN J, et al. Interventions to improve chronic cyclosporine A nephrotoxicity through inhibiting renal cell apoptosis: asystematic review[J]. Chin Med J(Engl),2013,126(19):3674-3774.
- [25] Martin-Martin N, Slattery C, Mc Morrow T, et al. TGF- β_1 mediates sirolimus and cyclosporine A-induced alteration of barrier function in renal epithelial cells via a noncanonical ERK1/2 signaling pathway [J]. Am J Physiol Renal Physiol,2011,301(6):1281-1292.
- [26] 段晓虹,董竞成,何立群,等.补肾活血方对慢性肾炎肾虚血瘀证患者蛋白尿、尿 IL-6、TGF- β_1 及 MCP-1 的影响[J].中国中西医结合杂志,2011,31(6):765-768.
- [27] 陈红梅,王秀兰,恩和苏仁,等.白豆蔻对阿霉素肾病模型大鼠肾脏组织 TGF- β_1 、PAI-1 表达的影响研究[J].中药药理与临床,2017,33(3):105-108.

[责任编辑 张丰丰]