

大黄酸对小鼠肾脏的毒性机制

胡樱凡, 黄婉奕, 李彦桥, 罗煜, 蒋晴, 梁雨生, 朱正文, 王平, 孟宪丽*
(成都中医药大学药学院, 成都 611137)

[摘要] **目的:**观察大黄酸长期给药对小鼠肾脏毒性的影响,探讨其可能的毒性机制,为临床合理用药及进一步研究提供一定依据。**方法:**昆明种小鼠30只,随机分为空白组和大黄酸低、高剂量组(0.175, 0.35 g·kg⁻¹),每组10只,雌雄各半。连续灌胃给药60 d。给药期间,观察记录小鼠的一般情况;停止给药后检测动物血清尿素氮(BUN),肌酐(Scr),丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)等指标。计算肾脏指数并检测肾脏中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽(GSH/GSSG),取肾脏,苏木精-伊红(HE)染色观察肾脏组织形态病理变化,免疫组化法检测肾脏转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)及半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白表达。**结果:**与同性别空白组比较,给药组小鼠BUN和Scr均升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),大黄酸高剂量组30 d后小鼠体质量下降明显,SOD活力明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),TNF- α 含量增多($P < 0.05$),Caspase-3表达明显上升($P < 0.05$),雄性给药组肾脏指数下降明显($P < 0.05$, $P < 0.01$),雄性大黄酸高剂量组GSH-Px含量显著下降($P < 0.05$),TGF- β_1 表达增强($P < 0.05$)。肾脏组织形态病理变化,大黄酸高剂量组可见肾小管管腔中出现蛋白管型,肾小球和肾间质毛细血管充血,肾小管上皮细胞肿胀和淋巴细胞小灶性增生,且雄性小鼠病变更严重,大黄酸低剂量组以上表现较高剂量组不明显。**结论:**大黄酸长期大剂量给药对小鼠肾脏存在一定毒性,在0.35 g·kg⁻¹·d⁻¹剂量下毒性作用明显,且雄性机体毒性更加明显。其潜在毒性机制可能为引起谷胱甘肽抗氧化系统失衡,诱发过度氧化,触发炎症反应,激活Caspase-3的表达,进而诱导细胞凋亡。

[关键词] 大黄酸; 长期毒性; 肾毒性; 氧化应激

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)11-0054-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20190821

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190102.1646.020.html>

[网络出版时间] 2019-01-05 10:25

Mechanism of Rhein on Renal Toxicity of Mice

HU Ying-fan, HUANG Wan-yi, LI Yan-qiao, LUO Yu, JIANG Qing, LIANG Yu-sheng,
ZHU Zheng-wen, WANG Ping, MENG Xian-li*

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

[Abstract] **Objective:** To observe effect of long-term administration of rhein on the kidney toxicity of mice, and explore its possible toxic mechanism, in order to provide some basis for rational clinical drug use and further research. **Method:** The 30 Kunming mice (half male and half female) were randomly divided into 3 groups: control group, low-dose rhein group and high-dose rhein group (0.175, 0.35 g·kg⁻¹), with 10 mice in each group. The intragastric administration lasted for 60 days. During administration, general situations of the mice were observed and recorded. Serum urea nitrogen (BUN), creatinine (Scr), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were detected after drug withdrawal. Kidney index was calculated, and glutathione peroxidase (GSH-Px) and reduced glutathione/oxidized glutathione (GSH/GSSG) ratio were measured. The kidneys were collected and histopathologically examined, and

[收稿日期] 20181111(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473149)

[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,博士,教授,从事中药药效与毒理学研究,E-mail: xlm999@cdutcm.edu.cn

the protein expressions of transforming growth factor beta ($TGF-\beta_1$) and cysteine aspartic acid specific protease-3 (Caspase-3) were detected by immunohistochemistry. **Result:** Compared with the control group of the same sex, BUN and SCr of the administration group increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In the high-dose group, the activity of SOD decreased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the expressions of TNF- α and Caspase-3 increased significantly ($P < 0.05$). In the male group, the renal index was significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the GSH-Px content in the male high-dose group was significantly decreased ($P < 0.05$), whereas the expression of $TGF-\beta_1$ was increased ($P < 0.05$). The histopathological changes of kidney were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. In the high-dose group, protein tubules were found in renal tubule lumen, glomerular and interstitial capillary congestion, tubule epithelial cell swelling and small focal proliferation of lymphocytes, and the pathological changes were more serious in male mice. The above performances in the low-dose group was less significant than those in the high-dose group. **Conclusion:** The toxicity of rhein in the kidney of mice was obvious at the dose of $0.35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, and the toxicity in male organism is more obvious. The mechanism of its potential toxicity may cause the imbalance of glutathione antioxidant system, induce excessive oxidation, trigger inflammatory reaction, activate the expression of Caspase-3, and then induce apoptosis.

[**Key words**] rhein; long-term toxicity; nephrotoxicity; oxidative stress

大黄为蓼科植物掌叶大黄、药用大黄、唐古特大黄的干燥根及根茎,性味苦寒,具有泻下攻积,清热泻火,凉血解毒,逐瘀通经,利湿退黄等功效。课题组前期研究发现,大黄可清除体内过度累积的自由基,干预内毒素血症模型大鼠体内氧化应激损伤的信号传导,发挥保护作用^[1]。近来有研究表明,大黄具有保护肝肾与肝肾毒性的“双向”作用^[2-5],随用药剂量的加大,治疗作用转变为对肝肾的损害作用。蒽醌类衍生物是大黄的主要活性成分,包括大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素等。已有研究表明,大剂量大黄素则可诱导肝 L02 和 HepG2 细胞凋亡,其毒性作用机制可能是通过线粒体凋亡途径实现^[6-7]。大黄酸虽为大黄中 5 种游离蒽醌中含量最低者,但其生物利用度最高,且有研究发现,对于肾小管上皮细胞 HK-2 及肝癌细胞 HepG2,蒽醌类成分毒性大小均为大黄酸 > 大黄素 > 芦荟大黄素^[8]。因此,研究大黄酸对机体的毒性作用机制尤为必要。本研究通过灌胃给予小鼠不同剂量的大黄酸,观察不同性别小鼠的毒性表现,结合氧化应激相关指标,探讨大黄酸产生毒性的机制,为大黄酸的进一步研究提供依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级昆明种小鼠 30 只,雌雄各半,体质量 18 ~ 25 g,由四川省医学科学院实验动物研究所提供,动物许可证号 SCXK(川)2013-0015。本研究获得成都中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号 TCM-2016-312)。

1.2 药物与试剂 大黄酸(宝鸡市辰光生物科技

有限公司,批号 20160601,纯度 $\geq 98\%$),蛋白酶抑制剂(瑞士 Roche 公司,批号 24348600),RIPA 裂解液(杭州联科生物技术股份有限公司,批号 71725031)。尿素氮(BUN),肌酐(SCr),丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD),白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),总谷胱甘肽(T-GSH)/氧化型谷胱甘肽(GSSG)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20170714, 20170830, 20170712, 20170713, 220670752, 228270724, 20170710, 20170710);苏木素,伊红(美国 Thermo 公司,批号分别为 20170308, 20170308);半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)一抗(美国 Cell Signaling 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)。

1.3 仪器 CP124S 型分析天平(德国 Sartorius 公司),Varioskan Flash 型全波长扫描式多功能酶标仪(美国 Thermo 公司),ZHWHY-100H 恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司),CX22 型光学显微镜(日本 Olympus 公司),RM2235 型石蜡切片机和 DM1000 型显微成像系统(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 5 周龄小鼠 30 只,雌雄各半,实验性饲养 3 d 后,按体质量和性别随机分为雌性空白组,雌性大黄酸低、高剂量组,雄性空白组,雄性大黄酸低、高剂量组,每组 5 只。大黄酸低、高剂量分别灌胃给予大黄酸 $0.175, 0.35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (给药剂

量由前期所做急性毒性实验确定), 空白组灌胃给予相同体积的 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)。连续给药 60 d。

2.2 一般情况观察 给药期间, 记录观察小鼠的一般行为情况, 如行为活动、精神状态、饮食饮水量、大小便颜色、体质量变化等。

2.3 血清生化指标检测 于末次给药后禁食 12 h, 摘眼球取血, 静置, 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 试剂盒检测血清 BUN, Cr, MDA, SOD, TNF- α , IL-6。

2.4 肾脏指数检测 小鼠处死后, 分离肾脏, 在预冷生理盐水中清洗后, 滤纸析干, 称重, 记录。根据左右肾脏质量和小鼠体质量计算肾脏指数。

2.5 肾脏谷胱甘肽抗氧化系统功能检测 左肾上半部分称重后用灭菌的剪刀剪碎, 加入已放入蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 组织裂解液质量体积比为 1:5, 匀浆, 静置 30 min, 4 $^{\circ}$ C, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 根据试剂盒说明书检测肾脏 GSH-Px 及 GSH/GSSG。

2.6 病理组织学检测 剩余左肾用 4% 多聚甲醛固定, 通过脱水, 包埋, 切片, 脱蜡, 苏木素-伊红(HE)染色, 树脂胶封片, 显微镜下观察组织病理学

变化, 采用显微成像系统进行拍照记录组织学损伤。

2.7 免疫组化检测肾脏 TGF- β_1 , Caspase-3 蛋白表达 右肾经多聚甲醛固定, 脱水, 包埋, 切片, 脱蜡后进行抗原修复, 分别孵育过氧化物酶阻断剂, 山羊血清, 一抗(TGF- β_1 , Caspase-3, 分别为 1:100, 1:800), 二抗(1:20), 辣根酶标记链霉卵白素工作液, 经 DAB 显色, 苏木素复染, 冲洗返蓝, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 树脂胶封片。显微镜下观察目的蛋白表达情况, 并采用显微成像系统拍照记录, Image Pro Plus 软件计算积分吸光度 IA 及对阳性表达细胞进行计数。

2.8 统计学处理 采用 SPSS 19.0 对数据进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大黄酸对小鼠一般情况的影响 与同性别空白组比较, 小鼠给予低剂量大黄酸后活动有减少, 体质量有降低, 且 60 d 后雄性小鼠体质量降低明显($P < 0.05$), 饮食饮水均无明显变化; 小鼠给予高剂量大黄酸后活动明显减少, 30 d 后雌雄小鼠体质量均减轻明显($P < 0.05, P < 0.01$), 饮食饮水无明显变化。见表 1。

表 1 大黄酸对不同性别小鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of rhein on body weight of mice of different genders($\bar{x} \pm s, n = 5$)

性别	组别	剂量 /g·kg ⁻¹	0 d	10 d	20 d	30 d	40 d	50 d	60 d
雌性	空白	-	28.70 \pm 3.28	29.78 \pm 3.35	33.26 \pm 3.25	34.76 \pm 3.96	36.24 \pm 3.72	35.30 \pm 2.60	36.88 \pm 2.37
	大黄酸	0.175	28.12 \pm 1.70	30.62 \pm 2.43	33.50 \pm 2.74	33.28 \pm 3.04	34.22 \pm 3.44	35.12 \pm 3.46	35.88 \pm 3.35
		0.35	27.78 \pm 2.59	29.98 \pm 2.76	28.98 \pm 1.97 ¹⁾	27.74 \pm 3.20 ¹⁾	29.22 \pm 3.87 ¹⁾	30.82 \pm 2.98 ¹⁾	31.64 \pm 3.06 ¹⁾
雄性	空白	-	30.02 \pm 3.63	37.50 \pm 4.07	40.04 \pm 3.34	42.94 \pm 3.57	45.88 \pm 3.78	44.78 \pm 3.47	47.60 \pm 3.67
	大黄酸	0.175	29.72 \pm 4.08	25.52 \pm 3.16	38.44 \pm 3.88	40.46 \pm 3.74	40.88 \pm 4.35	41.72 \pm 4.66	41.50 \pm 4.53 ¹⁾
		0.35	29.92 \pm 3.40	34.32 \pm 4.78	37.30 \pm 3.64	37.12 \pm 4.39 ¹⁾	36.33 \pm 5.07 ²⁾	38.75 \pm 4.48 ¹⁾	39.30 \pm 4.40 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 大黄酸对小鼠肾脏指数的影响 与同性别空白组比较, 雄性给药小鼠肾脏指数均有不同程度降低($P < 0.05, P < 0.01$), 雌性大黄酸给药小鼠肾脏指数有下降趋势, 但差异无统计学意义。见表 2。

3.3 大黄酸对小鼠血清 BUN, SCr, SOD, MDA, TNF- α , IL-6 水平的影响 分别与同性别空白组比较, 大黄酸高、低剂量组 BUN, SCr 水平均有不同程度上升($P < 0.05, P < 0.01$), 大黄酸高剂量组 SOD 活力明显降低($P < 0.05, P < 0.01$), MDA 水平升

高, 但差异无统计学意义。与同性别空白组比较, 大黄酸高、低剂量组 TNF- α 水平均上升, 其中雄性大黄酸高、低剂量组均上升明显($P < 0.05, P < 0.01$), 雌性大黄酸高剂量组上升明显($P < 0.05$), 雌性大黄酸低剂量组无统计学意义, IL-6 水平有上升趋势, 但差异无统计学意义。见表 3。

3.4 大黄酸对小鼠肾脏谷胱甘肽抗氧化系统功能的影响 与同性别空白组比较, 雄性大黄酸高剂量组 GSH-Px 活力明显下降($P < 0.05$), 雌性大黄酸高

表 2 大黄酸对不同性别小鼠肾脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of rhein on renal index of mice of different genders

($\bar{x} \pm s, n = 5$)

性别	组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	肾脏指数/ $mg \cdot g^{-1}$
雌性	空白	-	10.39 ± 0.61
	大黄酸	0.175	9.98 ± 0.78
		0.35	9.94 ± 0.21
雄性	空白	-	13.36 ± 0.64
	大黄酸	0.175	12.30 ± 0.40 ¹⁾
		0.35	9.34 ± 2.09 ²⁾

表 3 大黄酸对不同性别小鼠血清 BUN, SCr, SOD, MDA, TNF- α , IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of rhein on serum BUN, SCr, SOD, MDA, TNF- α , IL-6 in mice of different genders ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

性别	组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	BUN/ $mmol \cdot L^{-1}$	SCr/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	SOD/ $U \cdot mL^{-1}$	MDA/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	TNF- α / $ng \cdot L^{-1}$	IL-6/ $ng \cdot L^{-1}$
雌性	空白	-	23.88 ± 3.67	50.49 ± 6.97	15.46 ± 0.41	6.46 ± 1.37	123.12 ± 2.00	63.84 ± 5.39
	大黄酸	0.175	30.38 ± 3.42 ¹⁾	67.68 ± 1.64 ¹⁾	13.53 ± 2.87	7.91 ± 0.67	127.19 ± 4.78	61.31 ± 5.04
		0.35	32.15 ± 2.36 ¹⁾	74.27 ± 8.19 ²⁾	12.77 ± 1.52 ¹⁾	7.93 ± 0.72	133.41 ± 6.72 ¹⁾	90.04 ± 48.61
雄性	空白	-	24.53 ± 1.88	53.13 ± 5.72	15.44 ± 0.77	6.77 ± 1.33	118.29 ± 1.84	64.54 ± 9.98
	大黄酸	0.175	30.92 ± 2.48 ²⁾	66.53 ± 7.17 ¹⁾	12.65 ± 2.37	8.98 ± 1.09	126.62 ± 2.15 ²⁾	72.55 ± 20.21
		0.35	31.02 ± 2.06 ²⁾	76.65 ± 16.78 ¹⁾	12.52 ± 0.57 ²⁾	9.38 ± 1.58	129.24 ± 6.80 ¹⁾	77.06 ± 27.98

表 4 大黄酸对不同性别小鼠肾脏 GSH-Px 酶活力及 GSH/GSSG 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of rhein on GSH-Px activity and GSH/GSSG in kidney of mice of different genders ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

性别	组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	GSH-Px/ $U \cdot mg^{-1}$	GSH/GSSG
雌性	空白	-	34.60 ± 0.75	0.229 ± 0.031
	大黄酸	0.175	34.66 ± 3.58	0.209 ± 0.029
		0.35	32.27 ± 4.63	0.201 ± 0.033
雄性	空白	-	34.52 ± 2.52	0.211 ± 0.055
	大黄酸	0.175	31.15 ± 7.07	0.199 ± 0.029
		0.35	28.91 ± 2.46 ¹⁾	0.194 ± 0.029

表达量有上升趋势,但差异无统计学意义,雄性大黄酸高剂量给药组 TGF- β_1 表达量上升明显 ($P < 0.05$)。见图 2,表 5。

3.7 大黄酸对小鼠肾脏 Caspase-3 蛋白表达的影响

与同性别空白组比较,给药组小鼠肾脏 Caspase-3 阳性细胞表达均有上升,且大黄酸高剂量组上升明显 ($P < 0.05$)。见图 3,表 6。

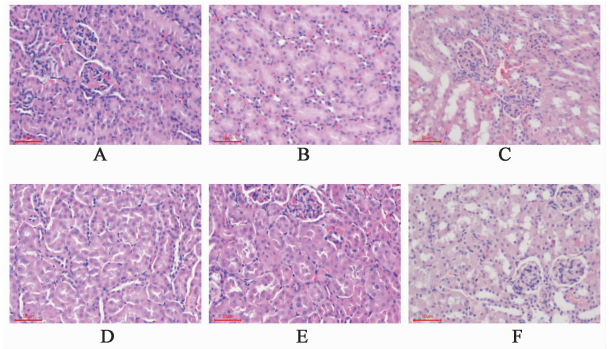
4 讨论

《神农本草经》中未直接陈述大黄毒性,但将其列为下品,而下品有“下药一百二十五种为佐使,主

剂量组有下降趋势,但差异无统计学意义;给药组 GSH/GSSG 均有不同程度降低,但差异无统计学意义。见表 4。

3.5 大黄酸对小鼠肾脏病理形态学的影响 大黄酸高剂量组可见肾小管管腔中出现蛋白管型,肾小球和肾间质毛细血管充血,肾小管上皮细胞肿胀和淋巴细胞小灶性增生,且雄性小鼠病变更严重,大黄酸低剂量组以上表现较高剂量组不明显。见图 1。

3.6 大黄酸对小鼠肾脏 TGF- β_1 蛋白表达的影响 与同性别空白组比较,雌性给药组小鼠肾脏 TGF- β_1



A. 雌性空白组; B. 雌性大黄酸低剂量组; C. 雌性大黄酸高剂量组; D. 雄性空白组; E. 雄性大黄酸低剂量组; F. 雄性大黄酸高剂量组 (图 2, 3 同)

图 1 大黄酸对不同性别小鼠肾脏组织形态的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of rhein on renal histomorphology of mice of different genders (HE, $\times 200$)

疗病以应地,多毒不可久服”之总括。近年来对大黄的毒理学研究也从实证角度明确了其毒性的客观存在^[9-11]。王青秀^[8]研究表明,小鼠长期、大剂量使用大黄会出现毒性反应,大黄中大黄酸、大黄素、芦荟大黄素等可引起 HK-2 细胞和 HepG2 细胞线粒体膜电位降低和细胞凋亡增加。本研究通过灌胃给予小鼠不同剂量的大黄酸,共计 60 d,从整体动物水平出发,探究大黄酸作用于小鼠肾脏的长期毒性机制。

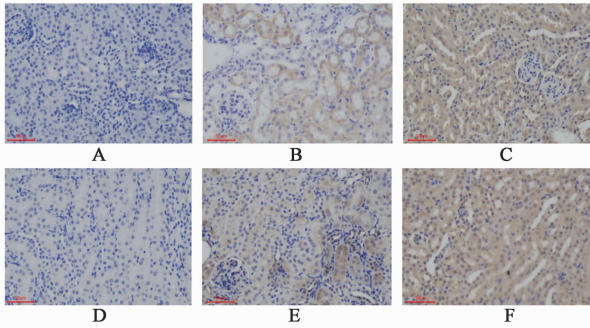


图 2 大黄酸对小鼠肾脏 TGF-β₁ 蛋白表达的影响(免疫组化, × 200)

Fig. 2 Effect of rhein on protein expression of TGF-β₁ in mouse kidney (IHC, × 200)

表 5 大黄酸对小鼠肾脏 TGF-β₁ 积分吸光度的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 5 Effect of rhein on IA of TGF-β₁ in mouse kidney ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

性别	组别	剂量/g·kg ⁻¹	IA
雌性	空白	-	0.100 ± 0.016
	大黄酸	0.175	0.109 ± 0.019
		0.35	0.111 ± 0.015
雄性	空白	-	0.104 ± 0.023
	大黄酸	0.175	0.134 ± 0.002
		0.35	0.156 ± 0.024 ¹⁾

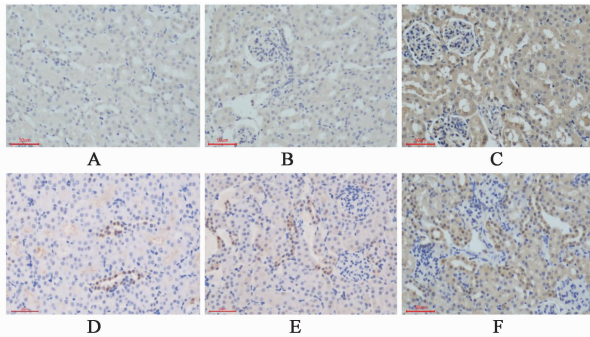


图 3 大黄酸对小鼠肾脏 Caspase-3 蛋白表达的影响(免疫组化, × 200)

Fig. 3 Effect of rhein on protein expression of Caspase-3 in mouse kidney (IHC, × 200)

肾脏是 BUN, SCr 的主要排泄场所,若血清中 BUN 和 SCr 含量偏高,则表明其排泄量少,肾功能可能受损,对于肾功能损伤早期诊断具有重要意义^[12]。灌胃给予小鼠不同剂量的大黄酸后,雌雄给药组小鼠血清 BUN 和 SCr 相较同性别空白组均有不同程度升高。结合肾脏指数变化及肾脏 HE 染色病理形态观察,给药组小鼠肾脏组织样本均见有不同程度地组织病理学改变,而雄性小鼠损伤表现

表 6 大黄酸对小鼠肾脏 Caspase-3 蛋白阳性细胞个数的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 6 Effect of rhein on number of Caspase-3 protein positive cells in kidney of mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

性别	组别	剂量/g·kg ⁻¹	阳性细胞数/个
雌性	空白	-	19.75 ± 7.84
	大黄酸	0.175	21.33 ± 3.78
		0.35	32.50 ± 6.75 ¹⁾
雄性	空白	-	24.58 ± 7.40
	大黄酸	0.175	26.22 ± 7.13
		0.35	37.93 ± 9.56 ¹⁾

更为明显。由此得出,大黄酸在 0.175, 0.35 g·kg⁻¹ 剂量给药小鼠 60 d 均会对肾脏产生毒性,且在 0.35 g·kg⁻¹ 时毒性更加明显。

氧化应激反应参与慢肾衰竭发生、发展,主要表现为抗氧化能力减弱及氧化应激增强,包括炎症反应、细胞凋亡等。谷胱甘肽抗氧化系统的动态平衡维持着机体正常的氧化代谢生理过程。SOD 活性及 MDA 水平可以反应机体抗氧化能力及脂质过氧化水平。大黄酸高剂量组血清 SOD 活力显著下降,低剂量组下降不明显;而 MDA 含量上升不明显。肾脏 GSH-Px 活力显著下降只表现在雄性大黄酸高剂量组。可见大剂量的大黄酸诱发雄性小鼠氧化应激损伤更为显著。

TNF-α 是具有多种生物学效应的细胞因子,机体内适量的 TNF-α 可起到抵抗病原菌和防御肿瘤的作用,但当其超过一定量时, TNF-α 反而可与其他炎症因子一起促进癌症的发生发展^[13]。大黄酸可显著增强 TNF-α 在血清的表达,而这种表达在雄性机体内更为明显,而同样作为炎症因子的 IL-6 无显著变化。TGF-β₁ 是关键致纤维化因子^[14],肾间质纤维化是导致慢性肾衰竭的主要原因之一。TGF-β₁ 也是在雄性高剂量组中有显著升高。Caspase-3 是重要的凋亡因子,是细胞凋亡信号通路上的关键蛋白酶。由此可见,高剂量大黄酸可通过激活蛋白 Caspase-3 的表达诱导细胞凋亡,且对雄性小鼠炎症因子的表达有显著增强。

综上所述,大黄酸长期大剂量给药对小鼠肾脏存在毒性,且在 0.35 g·kg⁻¹·d⁻¹ 时毒性较明显,而这种毒性在雄性机体上表现更为显著,可能与雌性机体内某些激素有关。大黄酸潜在毒性机制可能引起谷胱甘肽抗氧化系统失衡,诱发过度氧化,触发炎症反应,激活 Caspase-3 的表达,进而诱导细胞凋亡。

[参考文献]

- [1] 陈文, 张祎, 王沛明, 等. 大黄对内毒素血症模型大鼠氧化应激损伤的保护作用初探[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(15):112-116.
- [2] 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.
- [3] 曾灵娜. 基于“有故无殒”思想的大黄对肾脏保护与损伤双向作用的研究[D]. 昆明:昆明理工大学, 2012.
- [4] XUE J, CHEN F, WANG J, et al. Emodin protects against concanavalin a-induced hepatitis in mice through inhibiting activation of the p38 MAPK-NF- κ B signaling pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(4):1557-1570.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 赵玲, 胡昌江, 潘新, 等. 长期服用生大黄、熟大黄对大鼠肝肾功能影响的比较[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(15):1384-1387.
- [10] WANG J B, ZHAO Y L, XIAO X H, et al. Assessment of the renal protection and hepatotoxicity of rhubarb extract in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2009, 124(1):18-25.
- [11] WANG J B, KONG W J, WANG H J, 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.
- [12] 谭汉全, 尹雪梅. PTH、BUN 及 Cr 联合检测在肾功能损伤早期诊断中的临床价值[J]. 海南医学院学报, 2015, 21(2):197-199.
- [13] 向春艳, 何小燕, 李逐波, 等. TNF- α 在癌症中的作用研究进展[J]. 生命科学, 2012, 24(3):250-254.
- [14] XIONG J, SUN Q, JI K, et al. Epidermal growth factor promotes transforming growth factor- β_1 -induced epithelial-mesenchymal transition in HK-2 cells through a synergistic effect on Snail[J]. Mol Biol Rep, 2013, 41(1):241-250.

[责任编辑 张丰丰]