

关木通水煎剂对大鼠肾脏毒性的实验研究

肖惟丹 姚 琼

(湖北中医学院 武汉 430061)

摘要 目的:了解关木通水煎剂对大鼠肾脏毒性作用的毒理学特点。方法:分别给予正常大鼠 $0.625\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $10\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 关木通,观察其对肾脏形态和功能的影响。结果:给予 $0.625\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 关木通 8w k,大鼠肾脏形态和功能无改变。给予 $10\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 关木通 8wk,大鼠小管细胞变性明显,并有肾间质纤维化。结论:长期应用药典剂量关木通不造成明显的肾脏损害,而较大剂量应用则可致明显的肾功能异常。

关键词:关木通;药典剂量;肾脏毒性

中图分类号:R285.5, R361+2, R692.6 **文献标识码**:A

Aristolochia Manshuriensis Kom. decoction Induces Renal Impairment In Rats

XIAO Wei-dan, YAO Qiong

(Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei, China)

ABSTRACT Objective: To investigate mechanism and pathological changes reduced by Aristolochia manshuriensis Kom. decoction in the kidney of rats. **Methods:** Wistar rats were distributed into three groups. Group1 was normal control, Group 2 was received Aristolochia manshuriensis Kom. decoction $0.625\text{g}/\text{kg}$ body weight once daily for 8 weeks. Group 3 was received Aristolochia manshuriensis Kom. decoction $10\text{g}/\text{kg}$ body weight once daily for 8 weeks. After administration, mechanism and pathological changes in rats were investigated. **Results:** There were no abnormal function and pathological changes in the kidneys of rats in Group 2, while the kidneys of rats in Group 3 had obvious tubulointerstitial fibrosis. **Conclusion:** Taking Aristolochia manshuriensis Kom. in Chinese Pharmacopoeia dose for a long time induced no obvious renal damage, while large dose of Aristolochia manshuriensis Kom. induced significant renal damage.

Key words: Aristolochia manshuriensis Kom. decoction; Chinese Pharmacopoeia dose; Renal damage

前言

早在 1964 年国内就有报道指出关木通有严重肾毒性^[1],但并没有引起广泛重视。直到 1993 年比利时学者 Vanherweghen 等陆续报道了一些长期服用含中草药成分减肥药的年轻女性出现严重肾功能损害,且肾衰呈进行性发展之势^[2-4]。报告者认为减肥药中所含的广防己是导致肾脏损害的主要原因,因此而提出“中草药肾病”。现已基本清楚,广防己中导致肾脏损害的成分是“马兜铃酸”,国内学者按其病因称其为“马兜铃酸肾病”。针对现有的相关研究资料相对集中在长期或过量使用含马兜铃酸成分的中草药而导致的肾脏损害,我们选用了两种剂量的关木通对其肾脏毒性特点进行了实验研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 Wistar 大鼠,体重 $110\sim 150\text{g}$,由湖北省疾病预防控制中心实验动物中心提供。实验动物饲养于不锈钢鼠笼内;饲料为全价纯鼠颗粒饲料,由湖北省疾病预防控制中心实验动物中心饲料加工厂提供;饮用水为清洁自来水。

实验室温度为 $19\sim 29^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 $40\sim 80\%$; II 级动物实验室动物环境设施。

1.2 关木通煎剂的制备

关木通,系马兜铃科马兜铃属木通马兜铃(Aristolochia Manshuriensis Kom.)的木质茎,制成每毫升含生药 1 克的水煎剂,由湖北省中医院药剂科煎制。置入 4°C 冰箱保存,使用前加热至 37°C 。

1.3 动物分组,造模及给药剂量

雄性 Wistar 大鼠($110\text{g}\sim 150\text{g}$)共 30 只。随机分为三组:

组 1:正常组(10 只):自来水灌胃

组 2:药典剂量关木通组(10 只):每日灌胃关木通煎剂一次,剂量 $0.625\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$,共 8 周。(人的用量按 $6\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$,根据大鼠与人的每公斤体重剂量折算系数计算得出)

组 3:大剂量关木通组(10 只):每日灌胃关木通煎剂一次,剂量 $10\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$,共 8 周。

1.4 观测指标的测定

24 小时尿蛋白定量(三氯醋酸比浊法),尿 $\beta_2\text{-MG}$ (同位素放免法)。

肾组织形态学:8 周后,处死大鼠,取出右肾,常规石蜡包埋,切取 $3\mu\text{m}$ 石蜡切片,行 HE 染色。光镜下观察每例大鼠右肾病理变化并拍照。

在光学显微镜计算机图象分析系统屏幕上,计算病变累及的肾小管间质面积和全部肾小管间质面积。参照 Pirani^[5]介绍

作者简介:肖惟丹,(1982-),女,湖北中医学院 04 级硕士研究生
中医肾病方向
E-mail:fongjian@163.com Tel:13554055884
(收稿日期:2006-09-06 接受日期:2006-10-20)

的方法进行评分,病变累及面积少于1%为0分,1%-20%者为1分,20%-40%者为2分,大于40%者为3分,计算每组大鼠右肾小管间质病理积分的平均值作为其比较值,进行分析。

表-1 8周后三组大鼠 β_2 -MG 及尿蛋白定量平均值
Table.1 The average values of β_2 -MG and urinary protein excretion after eight weeks($\bar{x} \pm s$)

Group	n	β_2 -MG (ng/ml)	protein(mg)
Group1	10	4.37±0.46	3.52±0.33
Group2	10	4.42±0.46	3.72±0.38
Group3	10	5.24±0.59	4.00±0.48

compared to Group1 P<0.05 compared to Group1 P<0.01

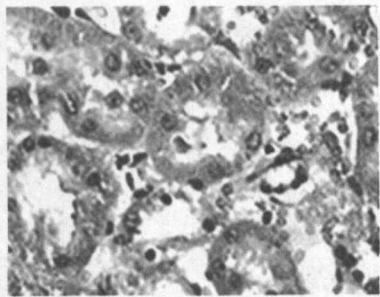


Fig.1 (group1) :normal

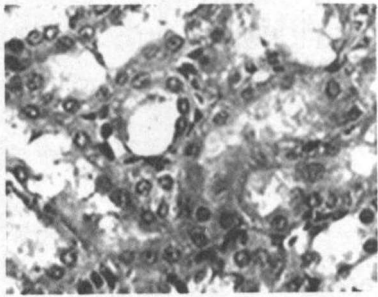


Fig.2 (group2) :normal

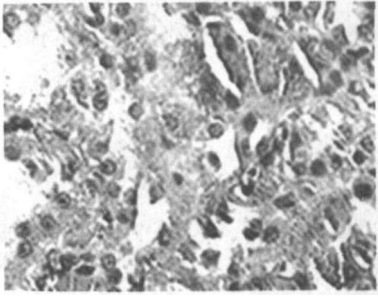


Fig.3 (group3): tubulointerstitial fibrosis.

图1和图2中肾脏结构基本正常,图3可见肾间质纤维化,小管细胞变性坏死。

2 结果

2.1 尿液生化学研究

实验第8周,药典剂量组尿 β_2 -MG 及24h尿蛋白定量均在正常范围,与正常组相比均无显著差异;大剂量木通组尿 β_2 -MG(P<0.01)及24h尿蛋白定量平均值(P<0.01)均高于正常组和药典剂量组(P<0.01),见Tab1。

2.2 肾脏形态学检查

第1组和第2组大鼠肾脏基本正常,第3组大鼠肾脏有轻度间质纤维化,肾小管上皮细胞变性、脱落、坏死。3组大鼠肾小球硬化改变则均不明显。见Tab2,Picture1-3。

3 讨论

迄今为止,在日本、英国、我国台湾和内地都报道了含有马兜铃酸的中药造成肾损害的病例,各国政府对于这些临床报道均做出了相应的反映,制定了相应的规定:法国卫生部在1994年宣布禁止销售含马兜铃酸药物;英国在1999年7月禁止销售含马兜铃酸草药;之后美国食物及药物管理局(FDA)发表了关于含马兜铃酸药物肾损害的系列公告。大量的报道和规定使得临床医师及患者对中药的毒副作用加以重视,这对于避免滥用及减少不必要的药物毒副作用具有十分重要的意义。然而,过分渲染中草药的毒副作用,甚至而因噎废食,则会对中药在肾脏病的应用方面带来巨大的负面影响,将来也势必影响到整个中医药发展及其在全球的推广。

人们对中药毒性的认识,可上溯到远古时代。《淮南子·修务训》所云:“神农尝百草之滋味,水泉之甘苦,……一日而遇七十毒。”由于中药是多成分的天然药物,每种成分又受到所含其他成分的制约。这种多成分之间的相互作用有时会使有毒成分

1.5 统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用t检验,计算均采用SPSS12.0软件。

表-2 8周后三组大鼠病理积分
Table.2 Tubulointerstitial histological points($\bar{x} \pm s$)

Group	n	points
Group1	10	0.00±0.00
Group2	10	0.00±0.00
Group3	10	1.90±0.74

compared to Group1 P<0.01

的中药在整体上并不显示有毒。所以中药的使用剂量适当与否,是确定中药整体有无毒性的的重要依据。

木通《中国药典》剂量为3-6g,而国内报道引起急性肾功能衰竭的剂量范围较大,在10-120g,多数在30g以上。而临床见的多数龙胆泻肝丸引起的肾损害患者服用此药并没有遵循辨证论治的原则,多为主动获得该药(如药店购买),并且长期连续用药,或反复间断服用,明显违反了辨证论治的原则。

研究表明,按药典推荐剂量用药8wk,对肾脏的形态和功能都无明显影响,但较长期大剂量应用木通确实可导致肾脏损害,主要表现为肾小管的空泡变性和坏死以及肾间质水肿和纤维化等,而肾小球的改变很轻。在实验的较早阶段,虽然尿 β_2 -MG 和24小时尿蛋白定量都在正常范围,但肾脏形态学方面已经出现异常。是否有其他因素在早期可能也参与了肾损害的发病过程,对此需做进一步研究以证实。

总之,研究表明,只有在用量远远超过药典推荐剂量且疗程较长时,才会产生明显的肾损害,这进一步提示 Vanherweghem 等所报道中的慢性肾功能衰竭的发生可能有其他对肾脏有毒性的物质参与。当然,我们并不能排除更长时间小剂量应用该药可产生肾脏损害的可能性,临床上长期应用此类药物时,仍应警惕肾脏毒性的发生。

参考文献

[1] 吴松寒. 木通所致急性肾功能衰竭2例报告 [J]. 江苏中医,1964, (10):12-13
[2] Vanherweghem JL, Depierreux M, Tielemans C et al. Papidly progressive interstitial renal fibrosis in young women:association with slimming regimen including Chinese herbs [J]. Lancet. 1993,341(8842): 387-91

(下转第83页)

因子主要有细胞周期素 (Cyclins)、细胞周期素依赖性激酶 (CDKs)、细胞周期素依赖性激酶抑制蛋白 (CKIs)。p27^{kpl} 蛋白是 CKIs 家族成员之一, Koff^[1] 于 1993 年发现, 其基因定位于染色体 12P12.0-13.1, 主要抑制 CyclinD-CDK2、CyclinE-CDK 2 等 G1 期激酶复合物, 阻止细胞由 G1 期向 S 期转化。p27^{kpl} 蛋白基因缺失、突变罕见于人类肿瘤, 但其蛋白水平在多种肿瘤中明显下降^[1]。Yasui 等报道 p27^{kpl} 阳性表达率和表达强度的降低与胃癌的进展期、浸润深度、淋巴结转移有显著相关性^[1]。王福生^[9]等发现胃癌中 p27^{kpl} 蛋白的表达与分化程度、淋巴结转移显著相关, 认为在胃癌中低表达反映了其恶性进展。研究中 p27^{kpl} 蛋白的降低与胃癌分化程度、浸润深度、淋巴结转移显著相关, 表明在胃癌进展中逐渐失去了作为细胞周期调控的负调节能力, 使癌细胞的恶性程度升高。因此, 检测 p27^{kpl} 在胃癌中的表达可反映胃癌的临床生物学行为, 从而间接预示胃癌患者的预后。

E2F-1 是转录因子 E2F 家族的成员, 通过与二聚体伴侣蛋白 (Dimerization Partner protein, DP) 结合形成有功能的异二聚体后, 结合到靶基因启动子中特殊的 DNA 序列上, 调节基因转录, 在细胞增殖分化及肿瘤形成过程中发挥作用。在 G1 早期与去磷酸化的 pRb 结合的 E2F-1/DP1 无生物学活性, 不能完成转录。在 G1 中后期去磷酸化的 pRb 被 cyclin D/ cdk4/ 6 和 cyclin E/ cdk2 所催化而磷酸化, 导致了 E2F1/DP1 的释放, 这种异源二聚体与 c-myc、DNA 聚合酶 α 、CDK、cyclin D1 等几个在细胞分裂进入 S 期所需的生长调控基因的启动子上的 E2F 位点结合, 激活了它们的转录, 使细胞进入 S 期。在 S 期, 通过 cyclin A/ cdk2 和 cyclin A/ cdc2 的催化, E2F-1/DP1 磷酸化, E2F-1 再次失活, 使细胞进入 G2/M 期^[6]。当细胞通过 M 期进入下一个细胞周期时, pRb 去磷酸化并再次结合到 E2F-1 上。因此, 在 G1 中后期和 S 期, E2F-1 的时控激活是正常细胞周期进展的关键。实验也证明 E2F-1 的过表达可引起大鼠胚胎成纤维母细胞向肿瘤细胞转化^[7]。本研究发现, 胃癌组织中的 E2F-1 呈高表达 (36.7%), 而癌旁正常黏膜中呈低表达 (17.6%), 说明在 E2F-1 胃癌中起癌基因作用。同时 E2F-1 在管状腺癌、粘液腺癌中及低分化胃癌中的表达较高, 而与不同分化程度、浸润深度的胃癌及有无淋巴结转移的胃癌之间无显著差异, 又说明

E2F-1 的高表达与胃癌发生有关, 并且是胃癌发生演进中的早期关键步骤。这与 Yasui 等^[1]对胃癌中 E2F-1 表达的研究及司晓辉^[9]对颌骨软骨瘤中表达的研究结果相符合。

4 结论

p27^{kpl} 在胃癌组织中的表达明显低于在正常组织, 其表达与胃癌的浸润深度、组织学分型、分化程度、淋巴结转移等病理参数相关; 相反, E2F-1 蛋白在胃癌组织中的表达却明显增强, 其表达与胃癌的组织学分型相关; p27^{kpl} 与 E2F-1 在胃癌中表达的呈负性相关, 对胃癌病人联合检测 p27^{kpl} 与 E2F-1 表达水平, 有助于判断病人预后, 为术后及时采取化疗及基因治疗提供可靠依据。

参考文献

- [1] 夏可义, 肖强, 陆云飞, 等. E2F-1 在胃癌中的表达及其临床意义 [J]. 中国肿瘤临床与康复, 2005, 12(2): 124-126
- [2] Koff A, Otsuki M, Polyak K, et al. Negative regulation of G1 in mammalian cell; inhibition of cyclinE dependent kinase by TGF- β [J]. Science, 1993, 260: 536-539
- [3] Hengst L, Read SI. Translational control of p27^{kpl} accumulation during the cell cycle [J]. Science, 1996, 271: 1861-1864
- [4] Yasui W, Kudo Y, Semba S, et al. Reduced expression of cyclin dependent kinase inhibitor p27 KIP1 is associated with advanced stage and invasiveness of gastric carcinoma [J]. Jpn J Cancer Res, 1997, 88: 625-629
- [5] 王福生, 蒋丹斌, 宋怀宇, 等. p27kip1 在胃癌中的表达与临床病理分期和预后的关系 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2000, 16(6): 487-488
- [6] Krek W, Xu G, Livingston DM. Cyclin A-kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of a S phase checkpoint [J]. Cell, 1995, 83(7): 1149-1158
- [7] Yang XH, Siadek TL. Overexpression of the E2F-1 transcription factor gene mediates cell transformation [J]. Gene Expr, 1995, 4: 195-204
- [8] Yasui W, Naka K, Suzuki T, et al. Expression of P27 Kip1, cyclin E and E2F-1 in primary and metastatic tumors of gastric carcinoma [J]. Oncol Rep, 1999, 6: 983-987
- [9] 司晓辉. 颌骨软骨肉瘤中 E2F-1 表达及意义 [J]. 北京口腔医学, 2000, 8(3): 125-127

(图 1, 图 2 请见封 3)

肖惟丹 (上接第 72 页)

- [3] Vanherweghem JL. Misuse of herbal remedies: the case of an outbreak of terminal renal failure in Belgium (Chinese herbs nephropathy) [J]. Altern Complement Med, 1998, 4(1): 9-13
- [4] Cosyns JP, Jadoul M, Squifflet JP, et al. Chinese herbs nephropathy: a clue to Balkan endemic nephropathy? [J]. Kidney Int, 1994, 45(6): 1680-8
- [5] Pirani L, Salinas-Madrigal L, Koss MN. Evaluation of percutaneous renal biopsy. In: Sommers SC, ed. Kidney pathology decennial [J]. New York: Appleton-Lentury-Crofts, 1975: 109-163
- [6] 叶志斌, 崔若兰. 服用木通煎剂引起肾脏损伤 1 例 [J]. 中国中药杂志, 1997, 22(9): 570
- [7] 唐政. 轻度肾小球病变伴严重小管间质损害, 中草药导致的肾损害 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1998, 7(5): 494-9
- [8] 崔太根, 王海燕, 尚明英. 药典法定剂量关木通对大鼠肾功能及间质

影响的研究 [J]. 中华肾脏病杂志, 2000, 16(2): 106-13

- [9] 赵青. 结缔组织生长因子在肾间质纤维化中的表达及其意义 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2002, 2: 21
- [10] 谌贻璞, 陈文. 马兜铃酸肾病存在四种临床病理类型 [J]. 中华肾脏病杂志, 2000, 16(6): 406-407
- [11] 陈扬为. 马兜铃酸肾病的认识及防治 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2003, 4(1): 46-47
- [12] 黄枝优, 何秀田. 马兜铃酸肾病的临床研究状况 [J]. 时珍国医国药, 2002, 13(8): 494-495
- [13] 张勉之, 张大宁. 补肾活血法治疗马兜铃酸肾病 65 例 [J]. 上海中医药杂志, 2003, 37(1): 30
- [14] 俞东容, 毛黎明. 马兜铃酸肾病及其防治 [J]. 浙江中医学院学报, 2002, 26(1): 22-23
- [15] 李红霞. 马兜铃酸肾病研究概况 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2004, 68: 145-147