

关木通肾毒性与剂量、时间的相关性研究

丁英钧¹ 王彦田² 李春香² 朱立¹ 赵玉庸¹

摘要 目的:研究关木通慢性肾损伤的功能改变和病理学变化与投药剂量、用药时间之间的关系。方法:取 60 只 SD 雌性大鼠随机分为 4 组,实验组 A、B、C 组按 $1\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $2\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $4\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 不同剂量分别给予关木通水煎液灌胃,正常对照组 D 组以等体积饮用水灌胃,分别于第 6、12、14 周末大鼠尾静脉取血,留取大鼠 24 小时尿液,测定相关肾功能指标,留取部分肾组织进行形态学检查,其余肾组织匀浆后测定相关指标。结果:在 3 个月观察期内《药典》法定剂量对大鼠肾功能及病理结构无不利影响,而剂量增大就会产生肾毒性,且与剂量、用药时间呈正相关。结论:关木通肾毒性是相对的。

主题词 关木通/毒性 肾疾病/化学诱导 @ 剂量时间相关性

Experimental Study on Correlativity of Renal Toxicity with Dose and Lasting Time of Medication for Caulis Aristolochiane Manshuriensis

Ding Yingjun¹, Wang Yantian², Li Chunxiang², et al.

(1. College of Integrated Chinese and Western Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091; 2. College of TCM, Hebei Medical University)

Objective: To study on relation of functional and pathological changes of for chronic renal damage of Caulis Aristolochiane Manshuriensis with dose and lasting time of medication. **Methods:** 60 SD female rats were randomly divided into 4 groups. Experimental group A, B, C were given intragastrically by $1\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $2\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ and $4\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ of Mutong Decoction, respectively, and the normal group (group D) by equal volume of potable water, and their blood samples were taken from the caudal vein at the ends of 6th, 12th and 14th weeks, and 24h-urinary were taken for determination of indexes of renal functions, and a part of the renal tissue was taken for morphological detection and other renal tissue was homogenized for determination of relative indexes. **Results:** The legal dose of pharmacopeia within 3 months did not have harmful effect on renal functions and pathological structures, but while the increase of the dose could induce renal toxicity, which is related with the dose and lasting time of medication. **Conclusion:** The renal toxicity of Caulis Aristolochiane Manshuriensis is relative.

Key Words Manchurian dutchmanspipe/toxicity renal diseases/chemical induction @ dose-time correlativity

马兜铃属(Aristolochia)植物关木通使用不当可以引起肾脏损害,早期文献报道多以大剂量服用关木通导致急性肾衰竭多见^[1,2];近年国内外报告此类肾损害多呈慢性病变^[3],通常是非大剂量长期服用关木通所致,为此我们进行了关木通慢性毒性试验,现将结果报告如下。

1 材料

1.1 动物:SD 雌性大鼠 60 只,体重 $180 \pm 20\text{g}$,河北医科大学动物中心提供。

1.2 药物与试剂:关木通由河北医科大学中医学院门诊部提供,产自东北,十月间采集。经河北医科大学药学院聂凤缇教授鉴定为马兜铃科植物东北马兜铃(Aristolochia manshuriensis kom),俗称关木通(Caulis Aristolochiane Manshuriensis)。关木通水煎液:取关木

通生药,4 倍清水浸泡 60 分钟,加热至沸腾后煎煮 40 分钟,倾出药液,残渣再加 4 倍清水沸腾后煎煮 40 分钟,然后两次药液合并后过滤,浓缩至所需浓度(含 1g 关木通/ml),分装密封,4℃保存,使用前加温至 37℃,并稀释到相应浓度。

试剂: β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)、 γ -L-谷氨酰转肽酶(γ -GT)试剂盒由南京建成生物工程研究所提供;血清、尿 β_2 -微球蛋白(β_2 -MG)放射免疫测定试剂盒购自天津九鼎医学生物工程公司;尿蛋白、尿糖、血尿素氮(BUN)、血肌酐(SCr)试剂盒购自北京生物工程高新技术公司;肿瘤坏死因子放免药盒(TNF RIA Kit)为解放军总医院放免所生产。

2 方法

2.1 实验方法:取 60 只大鼠随机分为 4 组,实验组为 A、B、C 组(每组 16 只),D 组为正常对照组(12 只)。A、B、C 组按 $1\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $2\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $4\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 3 个不同剂量分别给予关木通水煎液灌胃,D 组以等体积饮用水灌胃,每日 1 次,连续给药 12 周。给药期间大鼠自由进食、饮水。12 周后,继续饲喂 2 周。

基金项目:河北省卫生厅资助课题(20020012)

1 河北医科大学中西医结合学院·石家庄市新石南路 326 号(050091)

2 河北医科大学中医学院

收稿日期:2003-12-15;修回日期:2004-01-19

2.2 标本采集:自首次给药之日起,分别于第 6、12、14 周末大鼠尾静脉取血,用代谢笼留取大鼠 24 小时尿液,测定相关指标。第 6、12、14 周末各实验组宰杀 4、8、4 只大鼠,对照组每次宰杀 4 只,留取部分肾组织进行形态学检查,其余肾组织匀浆后测定相关指标。

2.3 肾功能检测:尿蛋白(微量双缩脲法)、尿糖(GOD-PAP 法)、NAG、 γ -GT(比色法)、血尿 β_2 -MG(放射免疫法)、血 BUN(尿素酶法)、血 SCr(苦味酸法)。

2.4 肾组织肿瘤坏死因子(TNF- α)含量测定:0.137mmol/L NaCl, 2.68mmol/L KCl, 10.13mmol/L Na_2HPO_4 , 1.76mmol/L KH_2PO_4 , 调 pH 至 7.4 为等渗缓冲液,肾组织及缓冲液以 1:9 的比例冰水浴中匀浆,3500r/分钟离心 25 分钟取上清液,按照试剂盒说明书加入相关试剂后在自动 γ 计数器上测定放射性,结果采用总蛋白校正。

2.5 肾组织形态学检查:10%中性甲醛固定大鼠肾组织,经脱水、透明、石蜡包埋,切片后行 HE、Masson 染色,普通光镜下观察。

2.6 统计学处理:使用 SPSS 11.0 统计软件,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间差异用单因素多水平

方差分析(One-way ANOVA LSD 法);尿酶活性资料系非正态分布的计量资料,采用非参数统计 Kruskal-Wallis H 检验。

3 结果

3.1 大鼠尿液相关指标的检测:(1)尿蛋白定量:与 D 组比较,6、12、14 周时 A、B 组无显著性增高($P>0.05$),但 B 组 12 周有升高趋势;6、12、14 周时 C 组明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(2)尿糖:实验 12 周 C 组尿糖较 D 组有显著性升高($P<0.05$);A、B 组与 D 组比较差异有显著性($P>0.05$)。(3)尿 NAG、 γ -GT:与 D 组比较,实验第 6、12、14 周 C 组尿酶显著升高(分别为 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.05$);A、B 组与 D 组比较差异无显著性($P>0.05$)。(4)尿 β_2 -MG:与 D 组比较,A 组无明显升高($P>0.05$);B 组 12 周升高明显($P<0.05$);C 组 6、12、14 周显著增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表 1。

3.2 大鼠血液肾功能相关指标的检测:(1)血 BUN、SCr:C 组 12 周与 D 组相比显著升高($P<0.05$);A、B 组与 D 组相比差异无显著性($P>0.05$)。(2)血 β_2 -MG:与 D 组比较,实验第 6、12、14 周 C 组显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);A、B 组与 D 组比较差异无显著

表 1 各组大鼠尿液相关指标变化比较($\bar{x}\pm s$)

组别	时间	鼠数	尿蛋白(mg/24h)	尿糖(mmol/L)	尿 β_2 -MG($\mu\text{g/ml}$)	尿 NAG(U/L)	尿 γ -GT(U/L)
D 组		12	1.27 $\pm$ 0.51	0.55 $\pm$ 0.13	2.22 $\pm$ 0.76	24.57 $\pm$ 3.64	28.33 $\pm$ 5.06
A 组	6 周	4	1.78 $\pm$ 0.88	0.62 $\pm$ 0.14	2.23 $\pm$ 0.79	29.50 $\pm$ 4.60	28.50 $\pm$ 5.68
	12 周	8	1.64 $\pm$ 0.80	0.67 $\pm$ 0.17	2.76 $\pm$ 0.89	27.31 $\pm$ 6.47	31.37 $\pm$ 4.65
	14 周	4	1.35 $\pm$ 0.77	0.51 $\pm$ 0.16	2.27 $\pm$ 0.59	24.12 $\pm$ 5.15	28.00 $\pm$ 5.10
B 组	6 周	4	1.68 $\pm$ 0.55	0.64 $\pm$ 0.13	2.51 $\pm$ 0.96	27.46 $\pm$ 6.09	30.00 $\pm$ 8.16
	12 周	8	2.36 $\pm$ 0.96	0.74 $\pm$ 0.22	3.97 $\pm$ 1.08*	28.96 $\pm$ 5.78	32.87 $\pm$ 5.11
	14 周	4	1.36 $\pm$ 0.69	0.60 $\pm$ 0.11	3.06 $\pm$ 1.45	26.15 $\pm$ 4.36	32.25 $\pm$ 7.08
C 组	6 周	4	3.18 $\pm$ 0.79*	0.69 $\pm$ 0.15	3.45 $\pm$ 1.45*	34.82 $\pm$ 5.25*	37.50 $\pm$ 6.13*
	12 周	8	6.39 $\pm$ 3.60**	1.23 $\pm$ 0.45*	4.72 $\pm$ 1.17**	42.46 $\pm$ 11.70**	47.78 $\pm$ 9.34**
	14 周	4	3.27 $\pm$ 0.81*	0.78 $\pm$ 0.11	3.76 $\pm$ 0.83*	30.37 $\pm$ 9.32*	39.25 $\pm$ 1.57*

与 D 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

表 2 各组大鼠血液肾功能相关指标变化比较($\bar{x}\pm s$)

组别	时间	鼠数	血 β_2 -MG($\mu\text{g/ml}$)	血 BUN(mmol/L)	血 SCr($\mu\text{mol/L}$)	TNF- α (ng/ml)
D 组		12	3.09 $\pm$ 0.46	5.31 $\pm$ 0.78	91.91 $\pm$ 10.81	2.17 $\pm$ 0.98
A 组	6 周	4	3.27 $\pm$ 0.56	5.68 $\pm$ 0.27	88.25 $\pm$ 13.14	2.41 $\pm$ 0.65
	12 周	8	3.27 $\pm$ 0.83	5.47 $\pm$ 0.75	96.37 $\pm$ 14.17	2.57 $\pm$ 0.87
	14 周	4	2.96 $\pm$ 0.20	4.94 $\pm$ 0.74	89.50 $\pm$ 24.89	2.43 $\pm$ 0.79
B 组	6 周	4	3.64 $\pm$ 0.96	5.18 $\pm$ 0.83	88.00 $\pm$ 11.01	2.17 $\pm$ 0.91
	12 周	8	3.73 $\pm$ 0.38	5.46 $\pm$ 0.74	92.00 $\pm$ 16.79	2.61 $\pm$ 1.42
	14 周	4	3.54 $\pm$ 0.28	5.15 $\pm$ 0.26	88.62 $\pm$ 11.61	2.47 $\pm$ 0.76
C 组	6 周	4	3.83 $\pm$ 0.55*	5.67 $\pm$ 0.63	101.0 $\pm$ 10.42	3.11 $\pm$ 1.03*
	12 周	8	4.24 $\pm$ 0.62**	6.24 $\pm$ 0.75*	148.6 $\pm$ 24.54*	4.19 $\pm$ 1.28**
	14 周	4	3.84 $\pm$ 0.41*	5.45 $\pm$ 0.71	108.25 $\pm$ 9.57	3.85 $\pm$ 1.18**

与 D 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

性($P>0.05$)。(3)A、B组与D组相比差异无显著性($P>0.05$),C组6、12、14周较D组升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表2。

3.3 肾脏病理学改变:普通光镜下可见,A组肾小球、肾小管、肾间质未发现明显病变。B组6周肾小球、肾小管、肾间质未发现明显病变,12周可见近曲小管刷状缘脱落,部分肾小管上皮细胞空泡变性,肾间质轻度水肿,肾小球无明显病变;14周则较12周时病变轻或无明显病变。C组6周可见肾小管上皮细胞空泡变性、颗粒变性,部分坏死,管腔变窄,肾间质无明显病变或轻度水肿,可见少量淋巴及单核细胞浸润,肾小球无明显病变;12周可见肾小管上皮细胞中/重度空泡变性或颗粒变性,大量坏死,部分管腔变薄,间质明显水肿,较多淋巴及单核细胞浸润,个别呈灶性聚集,部分可见轻、中度纤维化,肾小球无明显病变或轻度系膜增生;14周时见肾小管上皮细胞空泡变性或颗粒变性、部分坏死,部分管腔变薄或肾小管萎缩;间质可见不同程度纤维化,部分肾间质纤维化加重。

4 讨论

研究证实,关木通肾损害临床与病理表现多样,国内早期报道多表现为急性肾功能衰竭^[1,2],国外资料提示主要表现为“亚急性”或“快速进展性”肾小管-间质损害^[4,5],近年国内报告多呈慢性病程演变^[3]。其原因可能与用药剂量和持续时间有关,前者多属超大剂量短期用药,表现为急性肾衰;后者多为小剂量长期用药,表现为慢性肾毒性反应。实际上,几乎所有的药物都有引起机体损伤的潜力,各药物超出其范围达到中毒剂量时则成为毒物而引起某些特定器官损害。

实验设3个剂量组,最低剂量的设定参考2000年《中华人民共和国药典》记载的关木通规定用量3~6g/d,采用6g/d,按照成人平均体重60kg计算得出 $0.1\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的人类剂量,然后参照实验动物给药剂量换算公式^[6]得出大鼠给药剂量约为人类的7倍,我们按10倍计算得出大鼠的给药最低剂量为 $1\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,低、中、高剂量比例为1:2:4,即 $1\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、 $2\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、 $4\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

实验结果显示,低剂量组(A组)持续给药3个月,按《药典》规定剂量使用关木通没有出现肾毒性。中剂量组(B组)6周时未发现明显肾损伤迹象;12周时尿 $\beta_2\text{-MG}$ 与正常组相比升高,光镜仅见近曲小管刷状缘脱落,部分肾小管上皮细胞空泡变性,而停药2周后尿 $\beta_2\text{-MG}$ 及病理改变恢复,说明肾小管功能损害较轻,是可逆的,为非损害作用^[7],即机体发生的生物学变化是在机体代偿能力范围内,是暂时的和可逆的。高剂量组

(C组)6、12、14周时尿蛋白、血尿 $\beta_2\text{-MG}$ 、尿NAG、 $\gamma\text{-GT}$ 酶显著升高(分别为 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.05$),尿糖、血BUN、SCr 12周显著升高($P<0.05$);病理损害12周较6周重,14周肾小管损伤减轻,间质可见不同程度纤维化,部分肾间质纤维化加重。这说明,随着用药时间的延长肾脏损害逐渐加重,停药2周后实验动物肾功能有一定程度恢复,但部分肾间质纤维化加重,说明此期损害不稳定,有向两极发展趋势。因此可以得出结论,关木通肾毒性是相对的,在3个月观察期内《药典》法定剂量关木通水煎液对大鼠肾功能及组织形态学无不利影响,而剂量增大就会产生肾毒性,且与剂量、用药时间呈正相关。

参考文献

- 1 吴松寒. 木通所致急性肾功能衰竭2例报告. 江苏中医, 1964, (10): 12~14.
- 2 洪用森, 黄元林, 王永钧. 应用大剂量木通能肾功能衰竭致死. 浙江中医杂志, 1965, 8(12): 32.
- 3 湛晓璞, 陈文. 马兜铃酸肾病的临床病理表现及治疗. 中药新药与临床药理, 2001, 12(6): 393.
- 4 Vanherweghem JL, Depierreux M, Tielemans C, et al. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: Association with slimming regimen including Chinese herbs. Lancet, 1993, 341(8842): 387~391.
- 5 Reginster F, Jadoul M, van Ypersele de Strihou C. Chinese herbs nephropathy presentation, natural history and fate after transplantation. Nephrol Dial Transplant, 1997, 12(1): 81~86.
- 6 孙敬方. 动物实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 357.
- 7 张桥. 卫生毒理学. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 18.

慈方 慈方数字名医服务系统

作为医生,当您遇到疑难病时,您想有2000个名医作您的高参吗?

作为领导,您想请2000多位数字名医进医院,增强医院竞争力吗?

慈方数字名医服务系统——真正帮助医院、诊所和医生提高临床疗效的高级全科诊治咨询系统。该系统“复活”了张仲景、孙思邈、张景岳等古代名医,实现了2000多位临床各科数字名医联合会诊。系统自动给出疑难病优化中药处方、需要排查的疾病和相关检查项目,旨在提高临床疗效、避免漏诊、误诊,使用时医生通过客户端计算机提交患者的疾病信息,经Internet传至远程我方服务器,经过服务器运算后返回结果,即可打印出带有医院或诊所名称的咨询报告。

预付使用费(元)	150	1500	3000	9000	50000
可咨询次数(次)	10	110	230	750	3334
赠送次数(次)	0	10	30	150	1666

北京慈方医药科技有限公司, 开户行: 中国农业银行北京市昌平区支行回龙观分理处; 账号: 11-081401040006746. 欢迎免费试用! (方法详见慈方中医网 www.cifang.com)

热线电话: 010-80794581