

方药研究

复方配伍减低关木通肾毒性的实验研究

李春香¹ 丁里玉² 李国川¹ 窦玉红¹ 丁芳¹ 郝蕾¹

摘要 目的:观察含关木通的传统复方导赤散对大鼠的急性、慢性肾损伤,探讨其配伍、剂量、用药时间与关木通肾毒性的相关性。方法:用关木通、导赤散水煎液,分别以关木通每日 6g/kg、12g/kg、24g/kg 不同剂量给大鼠连续灌胃 7 天(急毒实验)和每日 4g/kg 连续灌胃给药 12 周(慢毒实验),观察各组大鼠肾功能及肾组织形态学变化;同时采用高效液相方法检测单味关木通药液、导赤散药液及导赤散拆方药液中马兜铃酸 A 溶出量。结果:关木通各剂量组均有导致大鼠肾功能及肾脏形态学损伤作用,且与剂量、用药时间呈正相关;复方导赤散配伍对大鼠造成的肾功能及肾脏形态学损伤均较单味关木通轻,且随剂量、用药时间的合理调配而肾毒性显著降低。复方导赤散药液中马兜铃酸 A 溶出量明显低于单味关木通药液组。结论:复方导赤散配伍具有减低关木通肾毒性作用;复方导赤散配伍和/或竹叶分别具有减低关木通中马兜铃酸 A 溶出量作用。

主题词 关木通/毒性 中药配伍

Experimental Study on Concerted Application of Complex Prescription for Reducing the Renal Toxicity of Aristolochia manshuriensis Kom

Li Chunxiang¹, Ding Liyu², Li Guochuan¹, et al.

(1. College of TCM, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091; 2. College of Pharmacy, Hebei Medical University)

Objective: To observe acute and chronic renal toxicity of the traditional prescription Daochi San containing Aristolochia manshuriensis Kom (GMT) in rats, and to probe into correlativity of concerted application, dose, administration time of the prescription with renal intoxicity of GMT. **Methods:** The rats were administrated with Decoction of GMT and Daochi San by intragastric infusion. The dosage of GMT is 6g/kg, 12g/kg and 24g/kg each day for 7 days (acute toxic experiment), and 4g/kg each day for 12 weeks (chronic toxic experiment), respectively. Changes of renal function and morphology of the renal tissue were investigated in all groups. Dissolved amount of aristolochic acid A in the Decoctions of single GMT, Daochi San and separated drugs of Daochi San were detected with high performance liquid chromatography. **Results:** All different doses of GMT induced injuries of renal function and renal morphology in rats, which were positively correlated with the dose and administration time. Concerted application of compound Daochi San could remit the injury of single GMT on renal function and renal morphology, and the renal toxicity was significantly decreased by rational dose and administration time. The dissolved amount of aristolochic acid A in compound Daochi San Decoction was lower than that in single Decoction. **Conclusion:** Complex prescription Daochi San can decrease renal toxicity of GMT, and Daochi San and/or bamboo leaves have significant action of decreasing the dissolved amount of aristolochic acid A in GMT.

Key Words Aristolochia manshuriensis Kom /toxicity; Concerted application of Chinese herbs

20 世纪 90 年代,欧美医学界提出的“中草药肾病”(CHN)成为一些国家拒绝部分中药入岸的理由,主要是因为一些药物可能导致肾脏损害,这些药物是指含有马兜铃酸(AA)成分的广防己、关木通、青木香、龙胆泻肝丸、排石口服液等 10 余种中药和中成药^[1~7]。根据中医传统用药特点,我们选择含有关木通的传统复方导赤散为例进行了系统的实验研究,并与单味药进行对比;同时采用高效液相色谱法检测单味关木通药液、复方导赤散药液及导赤散拆方药液中马

兜铃酸 A 溶出量,以期客观、公正地为关木通与传统复方导赤散中马兜铃酸 A 所致肾毒性的差异提供实质性依据。

1 材料

1.1 动物:SD 雌性大鼠 160 只,体重 180~200g,由河北省实验动物中心提供(合格证号:医动字 04057 号)。

1.2 药物及试剂:关木通购自河北医科大学中医学院门诊部,经河北医科大学药学院聂凤祉教授鉴定为马兜铃科植物东北马兜铃(Aristolochia manshuriensis Kom.)的干燥藤茎。关木通水煎液由本院中药制剂室制备。取关木通生药材 3000g,加水 6 倍,浸泡 60 分钟后,加热煮沸 40 分钟,倾出 I 液,药渣再加 4 倍量水,煎煮 30 分钟,倾出 II 液,然后合并两次药液,过滤、浓

基金项目:河北省中医管理局立项课题(200212)

1 河北医科大学中医学院中药研究室,石家庄市新石南路 326 号(050091)(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 河北医科大学药学院

收稿日期:2005-06-14;修回日期:2005-08-10

缩制成 1500ml 水煎液(相当于生药关木通 2g/ml), 4℃放置备用。使用前加温至 37℃。导赤散水煎液按王绵之主编的全国高等医药院校试用教材《方剂学》规定用量,由本院中药制剂室制备。取关木通、生地黄、生甘草梢各等份,竹叶减半,制备方法同关木通水煎液。

关木通供试溶液的制备:制备方法同前(每毫升含关木通生药 2g)。精密量取关木通药液 50ml,加 1.5 倍量 95%乙醇,静置,过滤,回收乙醇。药液放凉后,将药液的 pH 值调至 1,用氯仿萃取至氯仿液无色,15ml/次,收集氯仿液置蒸发皿中挥干,用无水乙醇溶解残渣,收集乙醇液置 25ml 容量瓶中,少量多次洗净,定容至刻度,4℃冷藏待用。导赤散及拆方供试溶液的制备:方法同前(每毫升含关木通生药 2g)。对照品溶液的配备:取马兜铃酸对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并稀释制成浓度为 0.183mg/ml 的标准贮备液,临用前甲醇稀释。马兜铃酸的浓度范围在 0.1098~3.66 μg/ml。

试剂:马兜铃酸 A 对照品(中国药品生物制品检定所,批号 746-9002);色谱纯甲醇(DIKMA);冰乙酸为分析纯。

1.3 仪器:美国 Waters 公司的高效液相色谱仪;515 (HPLC pump) 系统控制泵;Waters2487 紫外检测器;色谱柱为 DIKMA DiamonsilTM;C18 柱(250mm × 4.6mm, 5 μm);LG10-2.4A 型 Sartorius。

2 方法

2.1 导赤散对大鼠急性肾损伤的实验研究方法

2.1.1 动物分组及给药:70 只大鼠随机分为 3 组,即正常对照组(A 组)、关木通(B 组)、导赤散组(C 组),B 组及 C 组分别分为 B1、B2、B3 与 C1、C2、C3 3 个剂量梯度(n=10)。以上 6 组分别给予含关木通 6g · kg⁻¹ · d⁻¹、12g · kg⁻¹ · d⁻¹、24g · kg⁻¹ · d⁻¹ 的关木通、导赤散水煎剂灌胃,A 组每次给予等体积生理盐水灌胃。每日 2 次,连续灌胃 7 天。给药期间大鼠自由进食、饮水。

2.1.2 标本采集:7 天末,用代谢笼收集大鼠 24 小时尿液,并断头取血,检测大鼠尿糖(UGlu)、尿蛋白(Upro)、尿素氮(BUN)、肌酐(SCr)、β-微球蛋白(尿 β-MG)等生化指标,第 8 天实验结束时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。

2.1.3 肾功能检测:Upro(微量双缩脲法),UGlu(GOD-PAP 法),N-乙酰-β-D 氨基葡萄糖苷酶(NAG)、γ-谷氨酰转肽酶(γGT, 比色法),血、尿 β-MG(放射免疫法),血 BUN(尿素酶法),SCr(苦味酸法)。

2.1.4 肾组织形态学检查:用 10%甲醛固定大鼠肾组织,经脱水、透明、石蜡包埋、切片后染色处理,普通光镜下观察不同剂量组对大鼠肾小管及肾小球的损伤情况。同时进行肾组织免疫组化及细胞凋亡情况的观察。

2.2 导赤散对大鼠慢性肾损伤的实验研究方法

2.2.1 动物分组及给药方法:90 只大鼠随机分为 3 组,A 组为正常对照组(n=30),B 组给予关木通水煎液灌胃(n=30),C 组给予导赤散水煎液灌胃(n=30),按含关木通 4g · kg⁻¹ · d⁻¹ 计算;A 组以等体积生理盐水灌胃,每日 1 次,连续灌胃 12 周。给药期间大鼠自由进食、饮水。

2.2.2 标本采集:第 12 周,用代谢笼留取大鼠 24 小时尿液,各组分别宰杀 10、10、10 只大鼠,A 组每次宰杀 10 只,断头取血,检测相关指标。并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。

2.2.3 肾功能检测:方法和指标同前。

2.2.4 肾组织形态学检查:方法和指标同前。

2.3 马兜铃酸 A 溶出量的测定方法

2.3.1 色谱条件:以甲醇-水-冰乙酸(72:27:1)为流动相;检测波长 315nm;流速为 1.0ml/分钟;灵敏度为 0.5AUF。在此条件下,马兜铃酸的色谱分离度大于 2.0,理论塔板数不小于 2000,保留时间(tR)约为 15.4 分钟,不对称因子 1.0~1.20,无代谢物或其他杂质峰干扰。

2.3.2 标准曲线的绘制:取马兜铃酸 A 对照品 1.33mg,精密称定,置 10ml 量瓶中,加适量甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。分别精密吸取上述溶液 0.05ml、0.1ml、0.2ml、0.3ml、0.4ml、0.5ml、0.8ml、1.0ml,置 5ml 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。按上述色谱条件依法进样,测定峰面积。

2.3.3 最低检测限:称取马兜铃酸 A 对照品,加甲醇溶解并逐步稀释直至按上述确定的色谱条件进样,所得色谱图中马兜铃酸 A 峰高为噪音的 3 倍(信噪比 S/N=3)时,即为最低检测限。

2.3.4 回收率试验:依次精密称取关木通适量 5 份,分别加入马兜铃酸 A 对照品溶液,按“关木通供试溶液的制备”项下方法制备成供试溶液后,再按样品含量测定方法测定马兜铃酸 A 的含量。

2.3.5 测定:分别取马兜铃酸 A 对照品药液、关木通供试药液、导赤散及拆方供试药液,用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,取续滤液 20 μl 注入高效液相色谱仪,依据确定的色谱条件记录峰面积,以外标法计算马兜铃酸 A 的含量。

表 1 各组大鼠 UGlu、Upro、BUN、Ccr 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	UGlu(mmol/L)	Upro(g/24h)	BUN(mmol/L)	Ccr(ml/min)
A	10	1.99±0.55	6.01±1.29	16.33±2.34	2.12±0.13
B1	10	2.74±0.76*	6.68±1.49**	21.83±3.71*	1.52±0.11*
B2	10	5.80±1.24**	25.77±3.89**	31.10±4.65**	1.02±0.10**
B3	10	8.84±0.95**	40.85±6.63**	36.07±4.27**	0.70±0.10**
C1	10	2.08±0.44△	6.13±1.21△	16.75±1.16△	2.10±0.12△
C2	10	2.45±0.61△△	7.37±1.74△△	18.38±1.59△△	1.52±0.12△△
C3	10	4.85±1.05**△△	9.29±1.95**△△	19.13±4.25△△	1.11±0.10**△△

与 A 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与同等剂量 B 组比较, △ $P<0.05$, △△ $P<0.05$ 。表 2、表 3 同

表 2 各组大鼠 NAG、γGT、SCr 及尿 β-MG 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	SCr(mol/L)	NAG(U/L)	γGT(U/L)	尿 β-MG(μg/ml)
A	10	181.11±23.88	14.21±2.52	9.50±2.58	2.21±0.86
B1	10	294.38±19.50**	19.89±1.38*	16.06±2.49**	4.43±1.48*
B2	10	311.25±44.30**	23.22±3.61**	18.69±3.14**	4.65±1.45*
B3	10	480.37±60.18**	29.50±3.55**	24.69±5.25**	5.42±1.22**
C1	10	187.13±14.11△△	14.59±2.43△	9.13±1.28△△	2.39±0.80△△
C2	10	192.10±15.80△△	15.86±3.55△△	9.75±1.97△△	3.08±1.01*△
C3	10	199.63±12.22△△	18.96±3.25△△	14.88±1.24**△△	3.99±1.45**△

表 3 各组大鼠细胞因子含量比较($\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mgPr}^{-1}, \bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TNF-α	IL-1-β	IL-8
A	10	0.56±0.07	1.13±0.12	1.25±0.08
B1	10	0.79±0.08*	1.68±0.11**	1.77±0.11*
B2	10	1.09±0.07**	2.28±0.07**	2.16±0.17**
B3	10	1.39±0.13**	2.55±0.13**	2.55±0.13**
C1	10	0.58±0.06△	1.33±0.12△	1.39±0.09△
C2	10	0.79±0.05*△	1.53±0.05△△	1.71±0.12*△
C3	10	0.89±0.06**△△	1.89±0.13**△	1.87±0.21*△

2.4 统计学方法:数据以平均数±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)。数据统计应用 SPSS11.0 软件。

3 结果

3.1 导赤散对大鼠急性肾损伤的实验研究结果

3.1.1 对肾功能的影响:表 1、表 2 示,C1、C2 组大鼠 UGlu、Upro、尿 NAG、γGT 及血 BUN、SCr 与 A 组比较虽有升高,但无统计学意义;C2 组大鼠尿 β-MG、C3 组大鼠上述各项指标与 A 组比较均升高显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。C 组各剂量组与相同剂量 B 组比较,明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。C 组下各剂量组大鼠肌酐清除率(Ccr)与 A 组比较均有降低,且随剂量增加而降低显著,与相同剂量 B 组比较明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3.1.2 对大鼠细胞因子含量的影响:表 3 示,C1~C3 组大鼠血清、肾组织中细胞因子含量均较 A 组有所升高,且随剂量的增加而升高显著($P<0.05$);但 C1 组与 A 组比较无统计学意义($P>0.05$)。C 组与同等剂量 B 组比较有所降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。B1~B3 组大鼠血清、肾组织中细胞因子含量均较 A 组明显升

高,且随剂量的增加而升高显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3.1.3 对肾组织形态学的影响:光镜下 B 组各亚组可见不同程度的肾小管损伤,且随剂量的增加而损伤加重。B1 组大鼠可见部分肾小管细胞颗粒变性;B2 组大鼠可见部分肾小管上皮细胞水肿,小部分肾小管上皮细胞坏死;B3 组大鼠可见肾小管上皮细胞及间质细胞呈大片状坏死(粉染无细胞核结构)。C1 组大鼠无明显病理改变;C2 组大鼠可见部分肾小管轻度变性;C3 组大鼠可见肾小管上皮细胞中度变性、坏死。电镜下 B 组大鼠肾组织近曲小管上皮细胞稀疏排列,毛细血管增多、充血;细胞质内充满大小不等的空泡,细胞基底膜细胞质局灶性变性坏死。近曲小管线粒体水肿嵴有微绒毛急性坏死。间质细胞、线粒体高度水肿,间质细胞周围高度纤维化,其病理表现为急性肾小管坏死。C 组病变较 B 组轻。

3.2 导赤散对大鼠慢性肾损伤的实验研究结果

3.2.1 对肾功能的影响:表 4、表 5 示,C 组大鼠 Upro、尿 β-MG 与 A 组比较明显升高($P<0.01$);与 B 组比较,各项指标均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3.2.2 对大鼠细胞因子含量的影响:B 组大鼠 12 周时血清、肾组织中细胞因子含量与 A 组比较显著升高($P<0.01$);C 组大鼠 12 周时血清、肾组织中细胞因子含量与 B 组比较明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3.2.3 对肾组织形态学的影响:HE 染色观察发现,C 组大鼠 12 周时肾组织病理形态学变化明显轻于 B 组,肾小球形态基本正常。主要病理学改变仍在近曲肾

表 4 各组大鼠 U_{pro}、尿 β-MG、NAG、γGT 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	U _{pro} (mg/d)	尿 β-MG(mg/L)	NAG(U/L)	γGT(U/L)
A	10	1.39±0.21	1.79±0.55	25.78±9.16	26.33±5.24
B	10	3.74±1.20**	4.71±1.17**	42.40±9.74**	47.78±9.54**
C	10	2.58±0.43**△△	2.93±0.31**△△	30.59±3.79△	32.37±8.72△△

与 A 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 B 组比较, △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$; 下表同

表 5 各组大鼠血 β-MG、BUN、SCr 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	血 β-MG(mg/L)	BUN(mmol/L)	SCr(μmol/L)
A	10	2.74±0.51	4.67±0.34	96.00±18.95
B	10	4.37±0.47**	8.24±0.75**	148.62±34.94**
C	10	3.22±0.28△	5.04±0.39△△	107.75±15.78△

小管。PAS 染色观察发现, C 组大鼠肾组织病理形态学变化明显轻于 B 组, 肾小球、肾小管基底膜稍有增加。

3.3 样品中马兜铃酸 A 的含量关系: 关木通+生地黄>关木通>关木通+生地黄+竹叶>关木通+生地黄+甘草>关木通+竹叶+甘草>关木通+甘草>导赤散>关木通+竹叶。

4 讨论

对于关木通的肾毒性研究, 学术界大多认为, 马兜铃酸 A 是致毒成分, 主要是肾小管-间质性损害。因此, 减少关木通中马兜铃酸 A 的溶出量是防止肾小管-间质性损害的关键所在。中药汤剂多为复方, 现已证明, 由于药物的不同配伍, 对其某一种化学成分的溶解度也不同, 复方群药合煎与其中药物单煎所得到的化学成分往往不同, 其药效也有异。为此, 我们对含有关木通的复方导赤散进行了马兜铃酸 A 含量的测定。实验结果显示, 复方药液中马兜铃酸 A 含量明显低于单味关木通药液 41% 以上; 而含有关木通+竹叶各组马兜铃酸 A 的含量均低, 其中关木通+竹叶组最低(1.06 μg/ml), 较单味关木通降低了 62%, 较复方导赤散降低了 36%; 但凡含有关木通+生地黄各组马兜铃酸 A 的含量与单味关木通组相比均无统计学意义。说明复方导赤散配伍形式确有减低马兜铃酸 A 溶出量

的作用, 且竹叶作用最为显著, 提示竹叶可能是减低复方导赤散中马兜铃酸 A 溶出量的最佳配伍药物。

为了减少多种激素水平干扰, 本实验仅选用雌性大鼠进行肾毒性实验研究, 以确保数据的可比性。雌性和雄性在本实验中是否存在差异, 尚无文献报道, 有待今后的实验证实。

综上所述, 关木通或马兜铃酸的肾毒性不仅与其用量、时间有关, 而且与配伍、煎煮时间、用药方式等相关, 故关木通的肾毒性是相对的。中医临床用药是在辨证基础上, 根据药性按组方原则组成一定的剂量比例, 以复方形式用于临床。本实验进一步印证了中医理论及君、臣、佐、使配伍原则的科学性。因此, 在中医理论的指导下用药, 中药关木通的毒副作用是可以减轻和避免的。关于竹叶减低马兜铃酸 A 溶出量的作用机制尚需进一步研究。

参考文献

1 裴奇, 刘世红, 陈惠萍, 等. 木通所致大鼠急性肾损伤的实验观察. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1999, 8(1): 15~18.
2 希雨. 中药并不总是有益的 II: 中药广防己和关木通的肾毒性不容忽视. 国外医药·植物药分册, 2000, 15(5): 201~202.
3 尹广, 胡伟新, 黎磊石. 木通中毒的肾脏损害. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1999, 8(1): 10~14.
4 黎磊石. 由木通肾毒性研究带来的思考. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1999, 8(1): 1~2.
5 谌贻璞, 陈文. 马兜铃酸肾病存在四种临床病理类型. 中华肾脏病杂志, 2000, 16(6): 406~407.
6 马红梅, 郭俊华. 炮附子对关木通减毒作用的初步研究. 中草药, 2002, 33(4): 319~320.
7 Ono T, Eri M, Honda G, et al. Valvular heart disease and Chinese herb nephropathy. Lancet, 1998, 351(9107): 991~992.

第二次全国特色医疗名医学术交流会征稿通知

由北京聚医杰医药科技推广交流中心和中国特色医疗学术研究会联合举办的“第二次全国特色医疗名医学术会”定于 2006 年 11 月在广西桂林市召开, 现征文如下。

凡享誉一方的中医、西医、中西医结合医、民间医生、乡村医生中的名医均可投稿, 论文题材不限, 各科临床经验均可。入选论文作者参加会议, 论文入编《中国特色医疗临床经验优秀文集》(由出版社出版)。会议发“优秀论文证书”、“中国特色医疗名医证书”、“特色医疗研究学术贡献奖”奖牌, 国家级继续教育学分 8 分, 会后还组织赴越南首都河内考察。征文截止: 2006 年 10 月 20 日。

中国特色医疗学术研究会聘特约研究员: 各级各类中医、西医、中西医结合医均可, 寄一寸登记相片 2 张(反面写上姓名)和 160 元注册办证费, 即发聘书。

投稿地址: 北京市 100036-498 信箱征文组收, 信封上请注明“第二次名医会”字样, 邮编 100036。联系电话: 010-6787013859, 13387509223(可发短信), 欢迎登录中华特色医疗网, 网址: www.zhylnet.com。