

白附子对正常和肾阳虚证大鼠毒性作用的差异

谭 勇¹ 李 健² 陈 杲¹ 吕 诚¹ 赵宏艳³ 吕爱平^{1*}

(1. 中国中医科学院中医临床基础医学研究所, 北京市东直门内南小街 16 号, 100700;

2. 北京中医药大学基础医学院; 3. 中国中医科学院中医基础理论研究所)

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划重点课题(2006BAI08B01-01);

北京市教育委员会科技研究面上项目(KM200910025012)

* 通讯作者: lap64067611@126.com, (010)64067611

[摘要] 目的 从代谢组学角度探讨正常和肾阳虚证大鼠对白附子的毒性反应的差异。方法 将 80 只 SD 雄性大鼠随机分为肾阳虚证模型组和正常组, 采用肌肉注射氢化可的松琥珀酸钠的方法造模。造模结束后, 把两组大鼠随机分为低剂量、小剂量、中剂量和大剂量给药组和空白组, 每组 8 只; 对各给药组大鼠连续 14d 灌胃给予不同浓度的白附子溶液, 剂量依次为 0.32、0.64、1.28、2.56g/(kg·d), 空白组给予生理盐水; 末次给药 24h 后取血浆, 采用高效液相色谱-质谱联用的代谢组学技术检测血清促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质醇(COR)、环磷酸腺苷(cAMP)和环磷酸鸟苷(cGMP)。结果 氢化可的松造模可引起血浆代谢物溶血磷脂酰乙醇胺(LPE)水平和溶血磷脂酰胆碱(LPC)水平的下调。正常大鼠和肾阳虚证大鼠给予白附子后两者内源性代谢产物存在差异, 随着白附子剂量的增加, 正常大鼠 LPC 水平和 LPE 水平有下降的趋势, 而模型大鼠 LPC 和 LPE 水平基本保持在稳定状态。结论 肾阳虚证大鼠对白附子的毒性反应低于正常大鼠, 印证了在证候理论指导下进行中药毒性评价的合理性。

[关键词] 白附子; 肾阳虚证; 毒性反应; 代谢组学

Difference of Toxic Effect of *Rhizoma Typhonii* on Normal and Kidney-yang Insufficiency Rats

TAN Yong¹, LI Jian², CHEN Gao¹, Lü Cheng¹, ZHAO Hongyan³, Lü Aiping¹

(1. Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700; 2. School of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine; 3. Institute of Basic Theory of TCM, China Academy of Chinese Medical Sciences)

ABSTRACT Objective To explore the difference of toxic effect of Baifuzi (*Rhizome Typhonii*) on normal and kidney-yang insufficiency rats from the viewpoint of metabonomics. **Methods** Eighty SD male rats were randomized into normal group and kidney yang deficiency model group. After making the kidney yang deficiency model by injecting intramuscularly hydrocortisoni natrii succinas, the rats of two groups were randomized into the low, small, medium, large dose sub-groups and blank group with 8 in each. The medicated rats were administered by lavage the different concentrations of *Rhizome Typhonii* every day for 14 days, and the dosage was 0.32, 0.64, 1.28, 2.56g/(kg·d). The blank group was given normal saline. Twenty-four hours after the last medication, the blood plasma was obtained and used for testing adrenocorticotrophic hormone (ACTH), cortisol (COR), cyclic adenosin monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) with the liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) metabolomics technique. **Results** Hydrocortisone brought about the decline of lysophosphatidyl ethanolamine (LPE) and lysophosphatidyl choline (LPC) in blood plasma metabolite. There was a difference of endogenous metabolite between the normal and model rats caused by white prepared lateral root of aconite. With the dose increase, a trend of decline of LPC and LPE of normal rats existed, however, those of the model rats kept basically stable. **Conclusion** The toxic reaction of the kidney-yang insufficiency rats to *Rhizome Typhonii* was weaker than that of the normal rats, confirmed the rationality of evaluating the toxicity of Chinese medicines based on TCM syndrome theory.

Key Words *Rhizome Typhonii*; kidney-yang insufficiency syndrome; toxic reaction; metabonomics

目前中药临床前毒性评价多以正常动物为载体, 这种评价方法忽略了机体生理状态与病证状态下对中药毒性反应的差异性。因此, 所得的评价结果不足以充分、合理地说明中药的毒性。根据《黄帝内经》“有故无殒”的中药毒性理论, 用药只要对证,

药物毒性自然减低。本研究以常用有毒中药白附子为代表药, 结合代谢组学方法深入探讨白附子对正常大鼠和对证模型大鼠毒性作用的差异, 为中医证候理论评价中药毒性提供客观依据, 为深入分析证候与中药毒性关系提供方法学探索。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 80 只,体重(200±20)g,由军事医学科学院动物中心提供,许可证号:SCXK-(军)2007-004。饲养在中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物室,食用全价营养颗粒饲料。

1.2 药物和试剂

注射用氢化可的松琥珀酸钠粉针剂(天津生物化学制药有限公司,生产批号:20080604),用生理盐水配成浓度为 71.43mg/ml 溶液。白附子(北京燕京饮片厂,批号 081117,产地:四川),用乙醇提取制成 2g/ml 的溶液,由中国中医科学院中医基础理论研究所方证研究中心提取。血清促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质醇(COR)、环磷酸腺苷(cAMP)和环磷酸鸟苷(cGMP)放射性免疫试剂盒由北京普尔伟生物科技有限公司提供。

1.3 主要仪器

Sn-69513 型免疫计数器,液相色谱系统[沃特世公司(Waters Corp),米尔福特(Milford),美国],液相色谱/串联质谱仪(英国曼彻斯特公司)。

1.4 模型制备^[1]

大鼠臀部肌肉注射氢化可的松琥珀酸钠溶液,剂量为 35.715mg/(kg·d),连续 9d,制造肾阳虚证模型。

1.5 动物分组与给药

80 只大鼠适应性喂养 7d 后采用随机数字表法分为正常组和模型组各 40 只,造模结束再把两组大鼠分别随机分为低剂量、小剂量、中剂量和大剂量 4 个给药组和空白组,每组 8 只。分组当天对给药组和空白组大鼠分别灌胃给予 10ml/kg 的白附子溶液和生理盐水。低、小、中、大剂量组给药浓度依次为:0.32g/(kg·d),0.64g/(kg·d),1.28g/(kg·d)和

2.56g/(kg·d)。连续 14d。

1.6 观察指标及方法

腹腔注射 3%戊巴比妥钠 1.5ml/kg 麻醉大鼠,暴露股动脉,快速剪断血管,用吸管吸取血样,制备血清和血浆。按试剂盒说明书,放射性免疫法检测血清 ACTH、COR、cAMP 和 cGMP。采用高效液相色谱-质谱联用的代谢组学技术检测血浆内源性代谢物。

1.7 统计学方法

采用 SAS 8.2 统计软件,计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用广义线性模型两因素方差分析。代谢物指纹图谱数据采用正交偏最小二乘法对数据进行挖掘。

2 结果

2.1 各组大鼠血清相关指标比较

表 1 示,模型空白组的 ACTH 水平显著低于正常空白组($P < 0.05$)。两组 COR 水平随着剂量的增加有升高的趋势($P < 0.01$)。造模因素引起 cAMP 的下降($P < 0.01$)和 cGMP 的升高($P < 0.05$),随着剂量的增加,cGMP 有降低的趋势($P < 0.01$),正常组不同给药剂量对 cAMP 和 cGMP 影响不明显。

2.2 模型空白组与正常空白组大鼠代谢谱型的模式识别分析和代谢物成分鉴定

图 1 示,模型空白组与正常空白组大鼠血浆代谢物有显著差异,能够明显分开,提示造模因素较大程度的改变了雄性 SD 大鼠的血浆代谢谱型。对因子载荷图中两组分开贡献最大的代谢物(VIP>3)进行成分鉴定,发现 18:0 溶血磷脂酰乙醇胺(LPE),20:3 溶血磷脂酰胆碱(LPC),20:5LPC,18:3LPC 和 468.4m/z 未知化合物是两组分开的主要标志物。

表 1 各组大鼠血清 ACTH、COR、cAMP、cGMP 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 [g/(kg·d)]	鼠数	ACTH(pg/ml)	COR(ng/ml)	cAMP×100(pmol/ml)	cGMP×100(pmol/ml)
正常组	空白组	8	48.46±22.39	31.96±7.38	18.05±8.12	4.67±1.15
	低剂量组	7	36.49±25.26	31.82±6.66	18.20±1.02	5.90±1.11
	小剂量组	8	30.25±10.13	34.69±8.02	19.10±6.03	5.02±1.83
	中剂量组	8	34.00±13.25	31.19±8.08	18.08±0.88	4.74±0.74
	大剂量组	8	36.41±24.67	45.27±6.41 [△]	18.05±3.15	4.80±0.83 [△]
模型组	空白组	8	22.12±11.97 [*]	26.66±5.94	12.53±2.56	7.60±1.49
	低剂量组	7	38.83±15.27	28.61±6.43	14.68±2.04 [▲]	8.15±1.93 [▲]
	小剂量组	7	21.17±9.11	32.39±9.76	13.91±4.47 [▲]	5.88±0.99 [▲]
	中剂量组	7	23.73±11.69	29.52±14.03	16.81±2.40 [▲]	4.82±0.64 [▲]
	大剂量组	8	27.41±9.96	40.40±8.62 [△]	16.61±5.60 [▲]	5.51±2.46 [▲]

注:与正常组相同指标空白组比较,* $P < 0.05$;与本组相同指标低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$;与正常组内相同指标相同剂量组比较, $\Delta P < 0.05$ 。1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

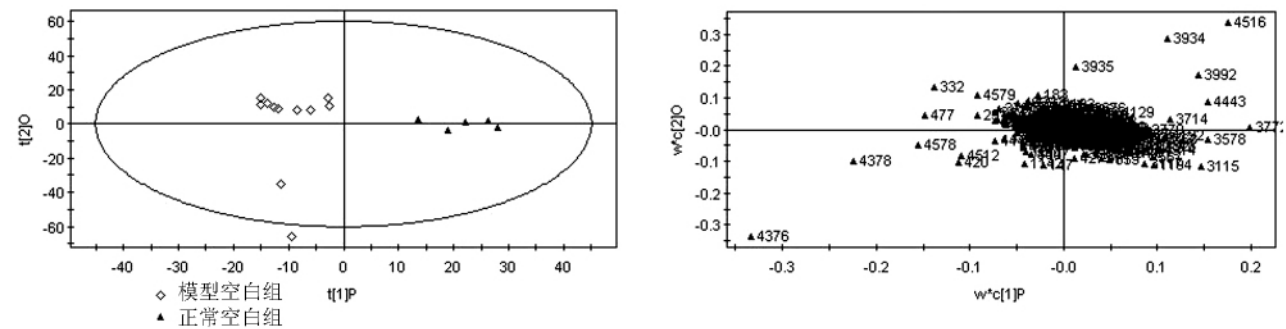


图 1 模型空白组和正常空白组血浆代谢组 OPLS 分值散点分布和因子载荷图

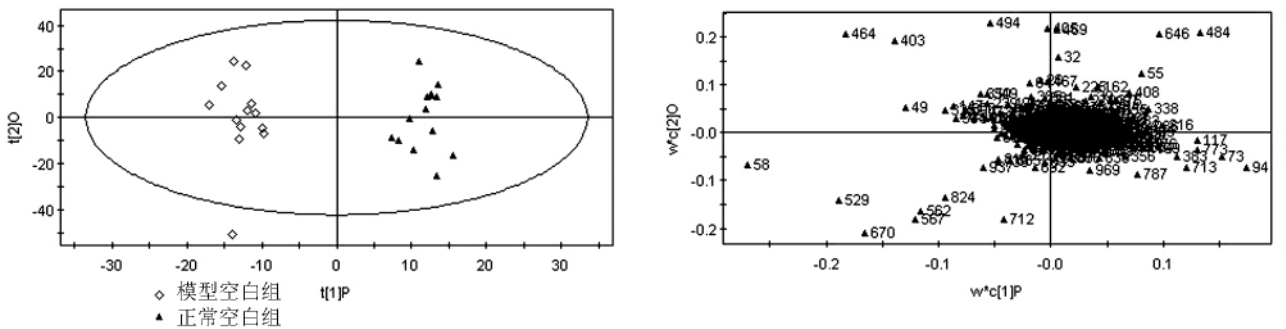


图 2 模型空白组和正常空白组血浆代谢组 OPLS 分值散点分布和因子载荷图

表 2 各标志物在各组大鼠中平均响应水平随给药剂量的变化情况比较($\bar{x}\pm s$)

组别		鼠数	18 : 0LPE	20 : 5LPC	302. 6m/z	468. 4m/z	318. 6m/z
正常组	空白组	8	16 960±4 720	11 599±5 143	1 090±145	8 810±1 200	970±297
	低剂量组	7	11 300±2 138**	10 823±4 988	1 505±962	4 756±1 500	1 257±715
	小剂量组	8	10 462±1 433**	7 546±2 993	3 287±2 378	4 802±1 760	2 534±1 487
	中剂量组	8	9 437±1 749**	4 656±733**	3 482±2 311	4 200±2 000	2 602±1 196
	大剂量组	8	9 333±3 350**	4 770±2 076*	3 352±2 134	4 100±1 345	2 172±1 288
模型组	空白组	8	12 048±2 839#	8 460±936#	1 204±838	9 230±936	986±532
	低剂量组	7	10 360±1 216*	5 330±329**	1 492±1 055	8 013±229**	1 098±807
	小剂量组	7	8 946±2 041	4 620±977**	1 800±955*	7 893±855**	2 000±1460
	中剂量组	7	10 296±1 399	5 150±360**	2 100±1 125	7 021±873**	2 200±1403*
	大剂量组	8	10 312±2 081	5 163±2 554	3 152±1 548**	6 400±508**	2 563±1 119**

注:与本组中空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与正常空白组比较,# $P<0.05$

2.3 模型各给药组与正常各给药组大鼠代谢谱型的模式识别分析和代谢物成分鉴定

图 2 示,模型各给药组与正常各给药组大鼠代谢物有显著差异,能够明显分开,提示白附子对模型大鼠和正常大鼠的影响不同。对因子载荷图中两组分开贡献最大的代谢物(VIP>3)进行成分鉴定,发现 18 : 0LPE、20 : 5LPC,以及质核比为 302. 6m/z、468. 4m/z 和 318. 6m/z 的 3 种未知化合物是两组分开的主要标志物。

2.4 各标志物在正常组与模型组中平均响应水平随给药剂量的变化比较

表 2 示,与正常空白组比较时,模型空白组 18 : 0LPE 和 20 : 5LPC 均降低($P<0.05$);正常组 18 :

0LPE 随剂量增加有下降的趋势,而模型组变化不明显;两组 20 : 5LPC 和 468. 4m/z 未知代谢物随剂量增加有下降的趋势,模型组下降的较缓慢;两组 302. 6m/z 未知代谢物和 318. 6m/z 未知代谢物随剂量的增加有升高的趋势,模型组升高的较缓慢。

3 讨论

现代毒理学研究表明,机体功能状态与药物毒性反应密切相关^[2]。目前多采用正常动物评价中药的毒性,这与中医辨证论治的临床实践不相符。因此,在“对证”的条件下研究中药的毒性更有必要性^[3]。

代谢组学强调把机体作为一个完整系统来研究,通过测定代谢物组成变化,来认识和反映机体代

谢网络在不同状态下的变化规律^[4],与中医学的整体观、动态观一致,适于中医药复杂体系研究^[4]。本研究运用代谢组学技术,从模式识别分析发现,两个空白组之间和两个给药组之间图中正交偏最小二乘法积分值基本集中分布于椭圆形散点图(95%置信区内)的4个区域,两组间无明显交叉和重叠,表明两个空白组之间及两个给药组之间都存在代谢产物谱的显著差异。18:0LPE,20:3LPC,20:5LPC,18:3LPC和468.4m/z未知化合物是两个空白组差异的主要血浆代谢物,可以作为肾阳虚证的生物标志物做进一步的研究。LPE和LPC是机体的溶血性甘油磷脂,它们能够调节基质金属蛋白酶的产生,促进细胞外基质及基底膜的降解,有助于激活蛋白激酶C,对血小板聚集和淋巴细胞的凋亡有重要的调节作用^[6-8]。LPE和LPC是在磷脂酶的作用下由PE和PC产生的,机体内PE和PC的含量决定了LPE和LPC的水平^[9]。PE和PC具有抗氧化和降血脂的功用,它们主要在机体各组织细胞内质网中合成,其中以肝组织最活跃^[10-11]。氢化可的松造模可引起肝细胞RNA含量下降、各种酶的活性下降和肝糖元减少等肝损害^[12],从而导致PE和PC下降。因此,造模引起的肝损害可能是肾阳虚模型大鼠LPE和LPC下降的原因。18:0LPE和20:5LPC,以及质核比为302.6m/z、468.4m/z和318.6m/z的3种未知化合物是两个给药组差异的主要血浆代谢物,提示白附子对不同状态下大鼠的影响不同。随着白附子剂量的增加,正常大鼠LPC和LPE有明显下降的趋势,而模型大鼠LPC和LPE水平基本保持在稳定状态。白附子的主要毒性成分是乌头碱。乌头碱可引起心肌细胞缺氧,导致心肌ATP大量耗竭^[13]。而ATP释放能量是PE和PC合成过程中的必要环节^[10]。乌头碱对正常大鼠的毒性作用明显,而对肾阳虚模型大鼠不产生明显的毒性作用,这可能是正常大鼠血浆LPC和LPE下降而肾阳虚模型大鼠保持稳定的原因。本研究发现的血浆代谢未知化合物,随着白附子剂量的增加,两种大鼠有不同的变化趋势,进一步说明了白附子对正常大鼠和肾阳虚模型大鼠的影响不同。

总之,本研究发现肾阳虚证大鼠对白附子的毒性反应低于正常大鼠,内源性代谢产物LPC和LPE及一些未知化合物的变化可能是白附子对两种机体状态产生不同毒性的原因。本研究印证了在证候理

论指导下进行中药毒性评价的合理性,对于白附子毒性作用的生物学本质,有待进一步研究。

参考文献

- [1]陈英华,欧阳轶强,孙琪,等.肾阳虚型动物模型规范化研究中诊断指标选择的初步探讨[J].中国中医基础医学杂志,2003,9(10):26-30.
- [2]杨仓良.毒药本草[M].北京:中国中医药出版社,1993:14.
- [3]简晖,谭勇,赵静,等.基于中医证候分类理论的中药安全性评价研究思路和方法[J].中国中医基础医学杂志,2008,14(9):652-654.
- [4]Zhang X, Wu H, Liao P, et al. NMR-based metabolic study on the eubacut toxicity of ariatolochic acid in rats[J]. Food Chem Toxicol, 2006, 44(7):1006-1014.
- [5]Coen M, Lenz EM, Nicholson JK, et al. An integrated metabolomic investigation of acetaminophen toxicity in the mouse using NMR spectroscopy[J]. Chem Res Toxicol, 2003, 16(3):295-303.
- [6]Kaden JJ, Dempfe CE, Sueselbeek T, et al. Time dependent in the plasma concentration of matrix metalloproteinase after acute myocardial infarction[J]. Cardiology, 2003, 99(3):140-144.
- [7]Hsieh CC, Yen MH, Liu HW, et al. Lysophosphatidylcholine induces apoptotic and non-apoptotic death in vascular smooth muscle cell: in comparison with oxidized LDL[J]. Atherosclerosis, 2000, 151(2):481-491.
- [8]Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, et al. Oxidized LDL modulates Bax/Bcl-2 through the lectinlike Ox-LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cell[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21(6):955-960.
- [9]Ren S, Shatadal S, Shen GX. Protein kinase C-beta mediates lipoprotein-induced generation of PAI-1 from vascular endothelial cells[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000, 278(4):656-662.
- [10]周爱儒.生物化学[M].北京:人民卫生出版社,2000:123-130.
- [11]Poutanen SM, Low DE, Henry B, et al. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada[J]. N Engl J Med, 2003, 348(20):1995-2005.
- [12]李春生,张国玺,石体仁,等.山茱萸水提取物对肾阳虚动物模型肝脏和睾丸影响的实验研究[J].中国中药杂志,2003,28(8):743-746.
- [13]Shimizu Hiroshi. NUR study of aconitine poisoning[J]. Wakan Iyaku Gakkaishi, 1985, 2(3):23.

(收稿日期:2010-08-19;修回日期:2011-01-12)