

关木通对大鼠肾上腺的毒效应及其可能机制

王迎春, 李海山, 仲来福*

(大连医科大学毒理学研究室, 辽宁 大连 116027)

摘要:目的 观察关木通(AMK)对大鼠肾上腺的影响及其与肾损害的关系,并探讨其可能机制。方法 ig 给予雌性大鼠 40 g·kg⁻¹·d⁻¹ AMK 水煎剂 1, 3 及 5 d,观测肾上腺和肾脏的重量,肾上腺和肾脏组织学及其超微结构变化,测定血清尿素氮、肌酐和皮质醇含量,免疫组化法检测 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)和诱生型一氧化氮合酶(iNOS)的表达。结果 给药 3 d 后,大鼠血清皮质醇明显增高,肾上腺皮质明显增厚;连续给药 5 d,大鼠血清尿素氮和肌酐明显增高,肾小管上皮细胞水肿,变性,坏死;给药组大鼠 8-OHdG 和 iNOS 明显表达。结论 AMK 可引起肾上腺皮质增生和肾损害,肾上腺损害早于肾损害,其毒效应机制可能与 DNA 氧化损伤和一氧化氮增多有关。

关键词:关木通; 肾上腺; 肾脏; 8-羟基脱氧鸟苷; 一氧化氮合酶

中图分类号: R996.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2006)04-0344-05

关木通(*Aristolochia manshuriensis* Kom., AMK), 又称木通,木通马兜铃,为马兜铃科(*Aristolochiaceae*)马兜铃属(*Aristolochia*)植物的中药材。近年来研究显示 AMK 有很强的肾毒性作用^[1],但 AMK 对内分泌系统损害的研究较少。已知肾上腺皮质是内分泌器官中对化学物质作用最敏感的腺体^[2],分泌的肾上腺皮质激素是机体重要生命活动所必需的激素^[3]。AMK 对大鼠肾上腺是否有毒效应,与肾损害之间的关系及其相关机制尚未见报道。本研究采用电镜,光镜形态学方法及放射免疫分析检测血清

皮质醇水平,还采用免疫组化技术检测肾上腺 8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)表达水平,综合评价 AMK 对大鼠肾上腺的影响,及其与肾损害的关系,并对其可能机制进行初步探讨。

1 材料与方 法

1.1 动物和试剂

健康成年 SD 雌性大鼠,体重 170 ~ 220 g, AMK 为市售饮片按中药传统煎制方法制备 AMK 水煎剂并测定其总马兜铃酸含量^[4];皮质醇放射免疫分析药盒购自天津九鼎医药生物工程有限公司;抗 8-OHdG 单克隆抗体购自日本老年病研究所;iNOS 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 大鼠分组及处理

36 只雌性大鼠随机分为 6 组,即给药 1 d 组,3 d 组,5 d 组及 3 个相应对照组。每日给药 2 次,给药剂量是 40 g·kg⁻¹·d⁻¹, ig, 对照组给予等量蒸馏水。于给药 d 2,4 及 6 断头取血,处死动物。

1.3 一般观察指标

一般状况观察包括精神状态、进食情况等。进行肾脏与肾上腺重量、血清尿素氮及肌酐含量测定。

1.4 液相平衡竞争放射免疫分析法检测大鼠血清皮质醇水平^[5]

室温下大鼠快速断头取血(1 min 内完成)于冷冻塑料试管内,低温高速离心,分离的血清 - 40℃ 保存。实验前,室温下轻柔搅拌,其余按试剂盒说明书操作。

1.5 肾脏和肾上腺形态学观察

左侧肾脏,肾上腺经 10% 甲醛固定,常规 HE 染色;右侧肾脏,肾上腺放入戊二醛内固定,超薄切片,供透射电镜观察。

1.6 肾脏和肾上腺 8-OHdG 和 iNOS 的免疫组化检测

具体操作步骤严格按照 UltraSensitive™ S-P 超敏试剂盒说明书进行。

收稿日期: 2005-11-08 接受日期: 2006-02-15

作者简介: 王迎春(1980 -),女,在读硕士研究生,研究方向为生化与分子毒理。

* 联系作者 E-mail: rdrczhong@dlmedu.edu.cn Tel: (0411)84720583 Fax: (0411)84720661

1.7 免疫组化结果分析

采用 Image-pro plus 4.5 图像分析软件半定量分析免疫组化的表达情况。加合物标志细胞百分数 (percentage of adduct labeling cell, PALC) 作为 8-OHdG 的定量指标^[6]。iNOS 阳性细胞为胞浆呈棕黄色,方法如下:①每组 6 只动物,每只动物取 1 张切片,每张切片取 3~5 个视野(400 倍)做图像分析;②测量每个视野中有阳性表达的区域积分吸光度(integrated absorbance, IA);③测量非阳性表达的区域平均吸光度作为背景的平均吸光度;④从阳性表达区域的 IA 中扣除背景的吸光度分量。具体做法是:阳性区域 IA - 背景平均吸光度 × 阳性区域面积;⑤计算每组阳性区域的 IA,以此作为 iNOS 表达强度的指标。

1.8 统计学方法

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),有差异者作 *q* 检验(Newman-Keuls 法),统计分析用 SPSS11.5 软件上机完成。

2 结果

2.1 关木通水煎剂中马兜铃酸含量

AMK 水煎剂中总马兜铃酸含量为 $3.29 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。给予大鼠 AMK 的剂量为 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,相当于总马兜铃酸剂量 $66 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。AMK 的临床用量为 3~6 g,本次实验所用的 AMK 剂量相当于临床用量的 6~7 倍。

2.2 一般状况观察

对照组大鼠皮毛光洁,反应灵敏,活泼好动,摄食正常。给药组大鼠皮毛蓬松,光泽度较差,易脱落,反应较迟钝,嗜睡,摄食差。

2.3 关木通对肾脏和肾上腺绝对重量与相对重量的影响

如表 1 结果所示,大鼠给药 3 d 后,肾上腺绝对重量和相对重量增大,明显高于相应对照组($P < 0.01$)。给药 5 d 后,肾脏绝对重量和相对重量增大,与相应对照组之间比有显著性差异($P < 0.05$)。

2.4 关木通对血清尿素氮、肌酐及皮质醇含量的影响

如表 2 结果所示,给药 5 d 后大鼠血清尿素氮和肌酐均显著高于相应对照组($P < 0.01$)。给药 1 d 后大鼠血清皮质醇含量与相应对照组比较无明显差异,给药 3 及 5 d 后血清皮质醇含量增高,与相应对照组比较均有非常显著性差异($P < 0.01$)。

2.5 关木通对大鼠肾脏和肾上腺形态的影响

肾脏病理组织学观察显示,给予 AMK 水煎剂 1,3 d 后大鼠肾组织未见明显异常。给药 5 d 后大鼠病变主要集中在皮髓交界处,大部分小管上皮细胞刷状缘及胞浆脱落,上皮细胞呈空泡变性,部分细胞坏死,管周毛细血管充血,小管腔内可见大量蛋白管型及崩解的胞浆组织,病变累及近曲小管,远曲小管和集合管。

肾脏透射电镜结果显示(图 1A),对照组大鼠肾组织未见明显异常。给予 AMK 水煎剂 5 d 后大鼠可见肾小管基底膜肿胀,内有电子致密物沉积,胞

Tab 1. Effects of *A. manshuriensis* Kom. (AMK) on absolute weight and relative weight of the bilateral kidneys and adrenals in rats

Treatment time/d	Group	Kidney		Adrenal	
		Absolute weight/g	Relative weight $\times 10^2/\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	Absolute weight/g	Relative weight $\times 10^2/\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
1	Control	1.80 \pm 0.17	0.85 \pm 0.06	0.067 \pm 0.091	0.035 \pm 0.010
	AMK	1.84 \pm 0.20	0.83 \pm 0.72	0.061 \pm 0.010	0.027 \pm 0.004
3	Control	1.66 \pm 0.81	0.88 \pm 0.04	0.065 \pm 0.005	0.034 \pm 0.002
	AMK	1.70 \pm 0.15	0.91 \pm 0.04	0.077 \pm 0.003 **	0.041 \pm 0.020 ***
5	Control	1.54 \pm 0.24	0.89 \pm 0.14	0.052 \pm 0.017	0.030 \pm 0.008
	AMK	2.01 \pm 0.34 * Δ	1.10 \pm 0.16 **	0.079 \pm 0.013 *	0.043 \pm 0.008 **

Animals were treated with distilled water (control) or $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ AMK ig for 1, 3 or 5 d. The samples were obtained on the next day after the last AMK administration. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with corresponding control; # $P < 0.05$, compared with 1 d AMK group; $\Delta P < 0.05$, compared with 3 d AMK group.

Tab 2. Effects of AMK on urea nitrogen, creatinine and cortisol in rat serum

Treatment time/d	Group	Urea nitrogen/mmol·L ⁻¹	Creatinine/μmol·L ⁻¹	Cortisol/nmol·L ⁻¹
1	Control	19.2 ± 4.6	56 ± 11	6.6 ± 2.2
	AMK	19.7 ± 2.2	59 ± 10	7.5 ± 1.0
3	Control	13.6 ± 2.5	70 ± 17	5.3 ± 1.6
	AMK	13.6 ± 4.2	68 ± 14	13.6 ± 1.7**
5	Control	16.5 ± 2.8	73 ± 8.0	6.0 ± 1.6
	AMK	104 ± 27**	177 ± 42**	9.2 ± 1.3**

The treatment was the same as in Tab 1. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. ** $P < 0.01$, compared with corresponding control.

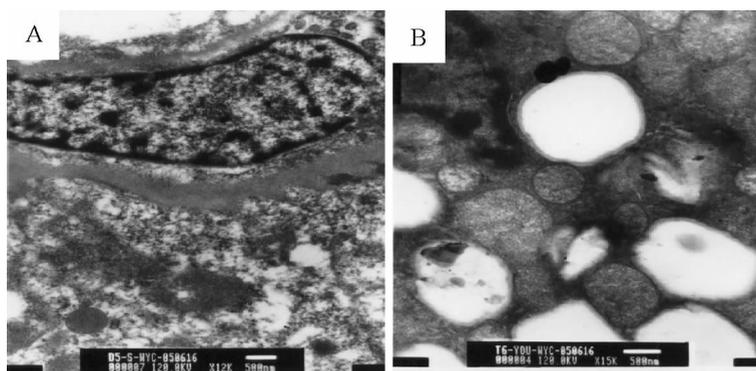


Fig 1. Morphological changes of kidney (A) and adrenal (B) in rats treated with AMK under electronic microscopy. A: Electron dense matter deposit and tubular basement membrane edema were seen in renal tubular epithelium; B: lipid droplets were seen in adrenal cortex.

浆内线粒体变形, 肿胀, 线粒体嵴肿胀, 断裂, 部分微绒毛肿胀, 断裂。

肾上腺病理组织学观察可见对照组肾上腺皮质结构清楚。给予 AMK 水煎剂 1 d 大鼠肾上腺皮质未见明显异常。给予 AMK 水煎剂 3 及 5 d 后大鼠肾上腺皮质明显增厚, 束状带细胞浆充满类脂质空泡, 束状带细胞排列略不规则。

肾上腺透射电镜结果(图 1B)显示, 对照组肾上腺皮质束状带细胞胞浆线粒体呈球状, 有光面内质网及脂滴。给予 AMK 水煎剂 3 d 后大鼠肾上腺皮质束状带细胞胞浆中含丰富的线粒体, 线粒体嵴呈空泡状, 含丰富的光面内质网及大小不等的脂滴。

2.6 关木通对肾脏和肾上腺组织 8-OHdG 表达的影响

结果显示, 肾组织中 8-OHdG 的表达在给药 1, 3 及 5 d 后明显增加, 主要位于皮髓交界处(图 2A)。肾上腺组织中 8-OHdG 的表达在给药 1, 3 及 5 d 后明显增加。8-OHdG 为强阳性, 细胞核着棕黄色(图 2B)。对照组虽然也有阳性染色细胞存在, 但强度与密度明显降低。

给药组肾上腺组织和肾组织中 8-OHdG 的 PALC 都明显高于对照组, 且统计学上有非常显著性差异 ($P < 0.01$); 给药 1 d 后与给药 5 d 后大鼠的肾上腺组织 8-OHdG 的 PALC 之间也有显著性差异 ($P < 0.05$, 表 3)。

Tab 3. Comparison of 8-OHdG expression in adrenal and kidney of rats treated with AMK for different time

Group	Treatment time/d	PALC/%	
		Adrenal	Kidney
Control	5	2.4 ± 1.1	4.3 ± 0.6
AMK	1	25.6 ± 9.7**	31.7 ± 13.2**
	3	38.2 ± 8.9**	36.5 ± 10.7**
	5	40.3 ± 13.2**#	57.7 ± 12.1**#

The treatment was the same as in Tab 1. PALC: percentage of adduct labeling cells, represents the expression level of 8-OHdG. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. ** $P < 0.01$, compared with control; # $P < 0.05$, compared with 1 d group.

2.7 关木通对肾脏和肾上腺组织 iNOS 表达的影响

如表 4 结果所示, 肾上腺组织和肾组织中 iNOS

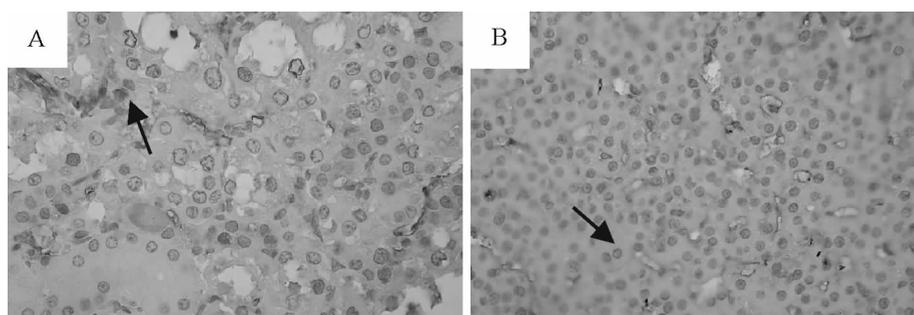


Fig 2. Positive staining of 8-OHdG in kidney (A) and adrenal (B) slice of rats treated with AMK by immunohistochemistry. Magnification $\times 400$. \uparrow : Positive staining was seen in renal tubular epithelium of corticomedullary boundary (A) and in adrenal cortex (B).

Tab 4. Comparison of iNOS expression in adrenal and kidney of rats treated with AMK for different time

Group	Treatment time/d	iNOS expression (IA $\times 10^{-3}$)	
		Adrenal	Kidney
Control	5	2.8 \pm 0.8	4.4 \pm 1.6
AMK	1	11.7 \pm 10.2 **	18.5 \pm 2.8 **
	3	25.5 \pm 4.3 **##	27.6 \pm 5.9 **##
	5	23.0 \pm 2.4 **##	25.3 \pm 4.1 **##

The treatment was the same as in Tab 1. IA: integrated absorbance per slice. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. ** $P < 0.01$, compared with control; ## $P < 0.01$, compared with 1 d group.

的表达在给药 1, 3 及 5 d 后明显增加, iNOS 阳性细胞均为胞浆染色, 胞核不着色, 对照组虽然也有阳性染色细胞存在, 但强度与密度均明显降低。

给药 1, 3 及 5 d 后大鼠肾上腺组织和肾组织中 iNOS 都明显高于对照组, 且存在统计学上非常显著性差异 ($P < 0.01$); 给药 3 及 5 d 后与给药 1 d 后 iNOS 阳性表达之间也有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。

3 讨论

本研究结果显示, AMK 水煎剂连续灌胃 3 d 后大鼠肾上腺绝对重量, 相对重量显著升高大于相应对照组, 表明给药组肾上腺有增生。HE 染色组织形态学观察, 给药 3 d 后肾上腺皮质明显增厚, 束状带细胞浆充满类脂质空泡, 束状带细胞排列略不规则。电镜下可观察到给予 AMK 水煎剂 3 d 后大鼠肾上腺皮质束状带细胞胞浆中含丰富的线粒体, 线粒体嵴呈空泡状, 边界清楚, 含丰富的光面内质网及大小不等的脂滴, 这些典型的分泌类固醇的超微结

构改变提示, AMK 可刺激大鼠肾上腺皮质增生, 给药 3 d 后大鼠血清皮质醇水平上升, 表明 AMK 促进大鼠肾上腺皮质束状带细胞分泌皮质激素即皮质醇的功能, 与前述的肾上腺皮质形态学改变一致。提示 AMK 具有促进大鼠肾上腺皮质增生及促进肾上腺束状带细胞分泌皮质醇的作用。

连续灌胃给予大鼠 AMK 水煎剂 5 d 后, 出现血清尿素氮和肌酐增高, 组织形态学观察与电镜结果都表明发生大鼠急性肾损害; 而肾上腺损害先于肾损害, 这可能与肾上腺是内分泌器官中对化学物质作用最敏感的腺体有关。

8-OHdG 是活性氧所致 DNA 氧化性损伤, 可作为检测氧化性损伤的标志物。应用 AMK 水煎剂组大鼠肾上腺组织和肾组织 8-OHdG 阳性染色细胞明显增多, 表明 AMK 对 DNA 进行了碱基修饰。AMK 所致 DNA 损伤的确切机制尚不清楚。

AMK 水煎剂组大鼠肾组织和肾上腺组织 iNOS 表达明显增强与对照组有显著差异, 提示 AMK 所致肾上腺皮质增生和肾损害可能与一氧化氮 (NO) 增多有关。NO 在一氧化氮合酶 (NOS) 作用下, 以左旋精氨酸 (L-Arg) 和 O_2 为底物催化而产生的。目前已知道有 3 种 NOS, 即 nNOS, eNOS 和 iNOS, 其中前两种合称为结构性一氧化氮合酶 (cNOS), 其催化活性依赖于细胞内钙离子浓度的升高, 受体激活瞬间释放 NO, 作用迅速而短暂 (数秒至数分钟), 作为细胞内信使具有多种生理功能^[7]。iNOS 的活性不依赖于钙离子^[8], 所以 iNOS 一旦诱导合成即可持续产生大量的 NO, 直到底物耗尽^[9]。另外, iNOS 的 mRNA 半衰期特别长, 一旦诱导合成即可持续长时间翻译, 合成 iNOS^[10]。所以与 eNOS 和 nNOS 比较, iNOS 是引起体内 NO 过量产生的主要基础, 大

量 NO 造成组织和细胞的损害甚至死亡。关于 iNOS 表达增多与肾上腺毒效应的关系尚不清楚,需进一步实验研究,但它为马兜铃属植物与致肾上腺皮质增生之间的关系提供了新的线索。

4 参考文献:

- [1] Arlt VM, Stiborova M, Schmeiser HH. Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies; a review [J]. *Mutagenesis*, 2002, **17**(4):265-277.
- [2] Colby HD. Adrenal gland toxicity: chemically induced dysfunction[J]. *J Am Coll Toxicol*, 1988, **7**(1):45-69.
- [3] Wei Q, Yang XF, Chen TJ, Du LT, Wang C, Chen Y. The toxication and mechanism of adrenal cortex intoxicated by toxic metals. I. The toxic effect of lead acetate on biosynthesis and regulation of adrenocortical hormone [J]. *Chin Occup Med* (中国职业医学), 1999, **26**(3):1-3.
- [4] Shang MY, Li J, Hu B, Yang S, Li CL, Zheng JH. Determination of total aristolochic acid in the stem of *Aristolochia manshuriensis*[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, **31**(12):899-900.
- [5] Chen L, Huang GZ, Zhang YH, Liu L, Liu SX. The effects of ethylacetate extract of *Tripterygium wilfordii* on adrenal glands in rats[J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1999, **34**(9):592-594.
- [6] Lv JC, Shi LY, Wu ZL, Liao YD, Zhou S, Li YY, et al. Study of 8-OHdG and its correlation with several cancer related gene in lung cancer tissues[J]. *J Hyg Res* (卫生研究), 2003, **32**(4):304-307.
- [7] Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide[J]. *Br J Surg*, 1995, **82**(12):1598-1610.
- [8] Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiological messenger molecule[J]. *Annu Rev Biochem*, 1994, **63**:175-195.
- [9] Billar TR. Nitric oxide. Novel biology with clinical relevance[J]. *Ann Surg*, 1995, **221**(4):339-349.
- [10] Bieler CA, Stiborova M, Wiessler M, Cosyns JP, van Ypersele de Strihou C, Schmeiser HH. ³²P-post-labelling analysis of DNA adducts formed by aristolochic acid in tissues from patients with Chinese herbs nephropathy [J]. *Carcinogenesis*, 1997, **18**(5):1063-1067.

Toxic effects and possible mechanisms of *Aristolochia manshuriensis* Kom on adrenals in rats

WANG Ying-Chun, LI Hai-Shan, ZHONG Lai-Fu*

(Department of Toxicology, Dalian Medical University, Dalian 116027, China)

Abstract: **AIM** To investigate the toxic effects and possible mechanism of *Aristolochia manshuriensis* Kom (AMK) on adrenals of rats and relationship between adrenal and kidney damage. **METHODS** Decoction of AMK 40 g·kg⁻¹·d⁻¹ was given ig to female rats for 1, 3 and 5 d, respectively. The observed items included absolute weight and relative weight, histology and ultrastructure of adrenals and kidneys, the serum level of urea nitrogen, creatinine and cortisol, and expression of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) and inducible nitric oxide synthase (iNOS). **RESULTS** After administration of AMK for 3 d, the serum cortisol level was markedly increased and adrenal cortex became thick. After administration of AMK for 5 d, urea nitrogen and creatinine significantly increased.

Histologically, edema, denaturation and necrosis were observed in renal tubular epithelium. The 8-OHdG and iNOS positive cells obviously increased in treated groups. **CONCLUSION** AMK would induce adrenal hyperplasia and kidney damage, the occurrence of adrenal damage was followed by kidney damage. The possible toxic mechanism is related to oxidative damage of DNA and nitric oxide increase.

Key words: *Aristolochia manshuriensis* Kom; adrenal gland; kidney; 8-hydroxydeoxyguanosine; nitric oxide synthase

* Corresponding author.