

苗药了哥王不同部位提取物的肾毒性研究[△]

任晨晨^{1*}, 冯果^{1,2#}, 李玮^{1,2}, 王建科², 彭礼珍¹, 朱光林¹, 王文静¹, 苏红梅¹(1. 贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025; 2. 国家苗药工程技术研究中心, 贵阳 550025)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)04-0419-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.04.07



摘要 目的 研究苗药了哥王不同部位提取物对健康大鼠的肾毒性作用, 为了了哥王的毒性作用机制及临床用药提供参考。方法 以70%乙醇为溶剂, 采用渗漉法提取, 得了哥王乙醇总提取物; 将上述提取物用水分散后, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取得相应部位提取物, 剩余为水部位提取物。将SD大鼠随机分为乙醇总提取物组、石油醚部位组、乙酸乙酯部位组、正丁醇部位组、水部位组和空白组, 每组12只(雌雄各半)。给药组大鼠灌胃相应剂量的药液(乙醇总提取物317.520 mg/kg、石油醚部位7.875 mg/kg、乙酸乙酯部位78.435 mg/kg、正丁醇部位53.865 mg/kg、水部位76.545 mg/kg), 每天1次, 连续给药2周, 再停药恢复2周; 空白组大鼠灌胃等体积1.0%羧甲基纤维素钠溶液。实验期间观察大鼠的一般情况, 取尿液(第14、28天)、血清和双肾组织(第15、29天), 计算其肾脏指数, 检测血清和尿液中的肾功能指标水平并观察肾组织的病理形态学变化。**结果** 给药期间, 与空白组比较, 乙醇总提取物组、乙酸乙酯部位组大鼠出现精神萎靡、活动量和进食量减少、大便稀薄、体质量下降等中毒行为活动特征; 石油醚部位组、正丁醇部位组和水部位组大鼠精神状态较空白组稍差, 活动量和进食量稍减少, 大便稀薄, 体质量增长缓慢; 但各组大鼠肛温无较大变化。给药2周后, 乙醇总提取物组大鼠的肾脏指数, 乙醇总提取物组、乙酸乙酯部位组大鼠血清中N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)水平, 正丁醇部位组大鼠血清中NAG水平, 水部位组大鼠血清中Cr水平, 以及乙醇总提取物组、石油醚部位组大鼠尿液中NAG水平, 乙酸乙酯部位组大鼠尿液中NAG、尿蛋白水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 在病理形态学观察中, 乙醇总提取物组、石油醚部位组和乙酸乙酯部位组大鼠有不同程度的肾小管结构不清、细胞肿胀、少数细胞坏死, 伴有肾小球固缩、肾小管硬化、炎症细胞浸润。停药后, 大鼠以上症状逐渐好转, 精神状态有明显改善, 活动量和进食量增加, 大便趋于正常。停药恢复2周后, 各给药组大鼠血清和尿液中上述指标水平均恢复至与空白组接近($P > 0.05$); 各给药组大鼠的肾小球结构逐渐恢复清晰, 乙醇总提取物组、石油醚部位组和乙酸乙酯部位组大鼠少见细胞肿胀和炎症细胞浸润。**结论** 苗药了哥王乙醇总提取物、石油醚部位和乙酸乙酯部位均具有一定的肾毒性, 且具有一定的可逆性。其毒性成分可能为脂溶性成分。
关键词 了哥王; 苗药; 肾毒性; 乙醇总提取物; 乙酸乙酯部位; 石油醚部位; 大鼠

Study on nephrotoxicity of the extracts from different parts of Miao medicine *Wikstroemia indica*

REN Chenchen¹, FENG Guo^{1,2}, LI Wei^{1,2}, WANG Jianke², PENG Lizhen¹, ZHU Guanglin¹, WANG Wenjing¹, SU Hongmei¹(1. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 2. National Engineering Research Center of Miao Medicine, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the nephrotoxicity of the extracts from different parts of Miao medicine *Wikstroemia indica* in healthy rats, and to provide reference for the study of its toxicity mechanism and clinical drug use. **METHODS** Using 70% ethanol as solvent, total ethanol extract of *W. indica* was extracted with diacolation method. After dispersing the above extract with water, the fractions of corresponding fractions were obtained with petroleum ether, ethyl acetate and *n*-butanol, and the rest was the extract of water fraction. SD rats were randomly divided into total ethanol extract group, petroleum ether fraction group, ethyl acetate fraction group, *n*-butanol fraction group, water fraction group and blank group, with 12 rats in each group (half male and half female). The rats in the administration groups were given the corresponding dose of drug solution intragastrically (total ethanol extract 317.520 mg/kg, petroleum ether fraction 7.875 mg/kg, ethyl acetate fraction 78.435 mg/kg, *n*-butanol fraction 53.865 mg/kg and water fraction 76.545 mg/kg), once a day, for consecutive 2 weeks, and then stopped taking drug for 2 weeks; rats in the blank group were given equal volume of 1.0% sodium carboxymethyl cellulose solution intragastrically. During the experiment, the general conditions of rats were observed. The samples of urine (on the 14th and 28th day), serum and bilateral renal tissues (on the 15th and 29th day) were taken respectively, the renal index was calculated, the levels of renal function indexes in serum and urine were detected, and the pathomorphological changes of renal tissues were observed. **RESULTS** During administration, compared with

[△] 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81760766, No.8206-0767); 全国中医药创新骨干人才培养项目(No.国中医药人教函[2019]128号); 贵州省药物新剂型新工艺科技创新人才团队项目(No.黔科合平台人才[2017]5655); 贵州省高层次创新型人才项目(No.黔人领发[2020]4号); 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(No.QZYY-2020-083); 贵州中医药大学博士启动基金项目(No.贵中医博士基金[2017]1号)

* 硕士研究生。研究方向: 中药新制剂新技术。E-mail: 465186826@qq.com

通信作者: 教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 中药新制剂新技术、药动学。电话: 0851-88233050。E-mail: 453989352@qq.com

blank group, the rats in the total ethanol extract group and ethyl acetate fraction group showed poisoning behavior and activity characteristics such as mental depression, decreased activity and diet, thin stool and decreased body mass. The mental state of the rats in the petroleum ether fraction group, *n*-butanol fraction group and water fraction group were slightly worse than that in blank group, and slightly decreased activity and diet as well as thin stool, and slowly increased body mass were found; however, there was no significant difference in anal temperature in each group. After 2 weeks of administration, the renal index in total ethanol extract group, the serum levels of *N*-acetylglucosaminidase (NAG), urea nitrogen (BUN) and creatinine (Cr) in total ethanol extract group and ethyl acetate fraction group, serum level of NAG in *n*-butanol fraction group and serum level of Cr in water fraction group, as while as NAG levels in urine of rats in total ethanol extract group and petroleum ether fraction group, NAG and urinary protein levels in urine of rats in ethyl acetate fraction group were increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In the pathomorphological observation, renal tubules showed different degrees of unclear structure, cell swelling and a few cell necrosis in the total ethanol extract group, petroleum ether fraction group and ethyl acetate fraction group, accompanying by glomerular pyknosis, renal tubular sclerosis and inflammatory cell infiltration, compared with blank group. After drug withdrawal, the mental state of rats in the administration groups were significantly improved, the amount of activity and diet increased, and the stool tended to be normal. Two weeks after drug withdrawal and recovery, the levels of above indexes in serum and urine of rats in administration groups returned to be close to that in blank group ($P > 0.05$); the glomerular structure of rats in each administration group gradually recovered clearly, and cell swelling and inflammatory cell infiltration were rare in total ethanol extract group, petroleum ether fraction group and ethyl acetate fraction group. **CONCLUSIONS** The total ethanol extract, petroleum ether fraction and ethyl acetate fraction of Miao medicine *W. indica* have certain nephrotoxicity and reversibility. The toxic component may be fat soluble.

KEYWORDS *Wikstroemia indica*; Miao medicine; nephrotoxicity; total ethanol extract; ethyl acetate fraction; petroleum ether fraction; rat

苗药了哥王是瑞香科植物南岭堇花 *Wikstroemia indica* (L.) C. A. Mey. 的根及根皮。该药始载于《岭南采药录》，性味苦寒、微辛，有毒，具有清热解毒、消肿散结、止痛等功效，主要用于治疗瘰疬、痈肿、风湿痛、百日咳、跌打损伤等^[1]。现代研究表明，了哥王具有抗菌、抗炎镇痛、抗病毒、抗肿瘤、抗疟、利尿、镇咳祛痰、降低心肌耗氧量和改善心肌营养性血流量等药理作用^[2-4]，常用于临床治疗慢性支气管炎、急慢性感染性炎症、颈淋巴结肿大、乳腺炎、肝炎、肝硬化、肝腹水、肾炎、肢体疼痛、带状疱疹、皮下剥离伤、坐骨神经痛及辅助治疗多种癌症（如乳腺癌、恶性淋巴瘤、肺癌及各种体表癌）^[5-9]。该药疗效确切，但毒性较大，在安全性方面存在较大问题，《生草药性备要》《岭南采药录》《广西中药志》《南宁市药物志》等著作均明确记载了哥王“大毒”或“有毒”。另外，本课题组在前期实验中对其提取物进行了急性毒性研究，发现其乙醇总提取物、石油醚部位和乙酸乙酯部位均有比较大的毒性^[10]，同时也对其炮制工艺、炮制前后药效和毒性变化等进行了探讨^[11-16]。为进一步明确了哥王的毒性部位、毒性作用脏器和毒性作用机制，本课题组对其肾毒性进行研究，以期为了哥王的毒性作用机制及临床用药提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

ADVIA 1800 型全自动生化分析仪购自德国 Siemens 公司；BX53F 型光学显微镜购自日本 Olympus 公司；KD-3368 旋转型组织切片机构购自浙江省金华市科迪仪器设备有限公司；FA2004 型电子分析天平购自上海衡

平仪器仪表厂；Targin VX-02 型多管涡旋振荡器购自北京踏锦科技有限公司；MIKRO 220R 型低温高速离心机购自德国 Hettich 公司；Sorvall RC 6+ 离心机购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；202-3AB 型电热恒温干燥箱购自天津市泰斯特仪器有限公司；BJ1 型不锈钢代谢笼购自湖南长沙市天勤生物技术有限公司。

1.2 主要药品与试剂

了哥王药材于 2019 年 12 月购自广西壮族自治区玉林市玉州区玉林银丰国际中药港，经贵州中医药大学药学院李玮教授鉴定为真品。*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶 (*N*-acetylglucosaminidase, NAG)、血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、尿蛋白、肌酐 (creatinine, Cr) 试剂盒均购自南京建成科技有限公司，批号分别为 20190512、20190515、20190512、20190510；甲醛购自重庆茂业化学试剂有限公司，批号为 20181216；二甲苯购自重庆川东化工有限公司，批号为 200180610；苏木精、伊红染料均购自北京索莱宝科技有限公司，批号分别为 G1140、G1120；戊巴比妥钠购自美国 Sigma 公司，批号为 922L0310；其余试剂均为分析纯，水为蒸馏水。

1.3 动物

本研究所用实验动物为 SPF 级 SD 大鼠，雌雄各半，体质量为 (200 ± 20) g，购自湖南长沙市天勤生物技术有限公司，动物生产许可证号为 SCXK(湘)2019-0014，动物合格证号为 43000200002163。所有大鼠均饲养于 12 h 光照/12 h 避光循环、温度 (25 ± 1) °C、相对湿度 (50 ± 10)% 的动物房内，自由摄食、饮水。

2 方法

2.1 了哥王药材不同部位的制备

取了哥王药材 7.9 kg, 用 12 倍量的 70% 乙醇以 3 mL/(min·kg) 的流速渗漉提取, 提取液回收乙醇至无醇味, 浓缩、真空干燥后, 粉碎成细粉, 得了哥王乙醇总提取物 796.32 g (1 g 相当于了哥王药材 9.92 g)。取乙醇总提取物药粉 408.0 g, 用水分散, 依次用等体积的石油醚 (沸程 60~90 °C)、乙酸乙酯、正丁醇萃取 3 次, 每次萃取 1 h, 分别合并石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取液, 挥干溶剂, 干燥后, 粉碎成细粉, 得到石油醚部位 14.49 g (1 g 相当于了哥王药材 408.87 g)、乙酸乙酯部位 147.70 g (1 g 相当于了哥王药材 40.12 g)、正丁醇部位 101.20 g (1 g 相当于了哥王药材 58.55 g)。剩余的水溶液浓缩、干燥后, 粉碎成细粉, 得水部位 144.00 g (1 g 相当于了哥王药材 41.15 g)。

2.2 药液的配制

分别精密称取乙醇总提取物 0.794 g、石油醚部位 0.020 g、乙酸乙酯部位 0.196 g、正丁醇部位 0.135 g、水部位 0.191 g, 分别加入 1.0% 羧甲基纤维素钠 (sodium carboxymethyl cellulose, CMC-Na) 溶液配制制成 50 mL 的样品混悬液, 备用。

2.3 分组与给药

取 SD 大鼠 72 只, 常规饲养适应 1 周后, 随机分为乙醇总提取物组、石油醚部位组、乙酸乙酯部位组、正丁醇部位组、水部位组和空白组, 每组 12 只 (雌雄各半)。给药组大鼠灌胃相应剂量的药物, 每天 1 次, 连续给药 2 周, 再停药恢复 2 周; 空白组灌胃等体积 1.0% CMC-Na 溶液, 每天 1 次, 连续 2 周。给药期间, 所有大鼠均正常摄食、饮水。给药剂量分别为: 乙醇总提取物 317.520 mg/kg、石油醚部位 7.875 mg/kg、乙酸乙酯部位 78.435 mg/kg、正丁醇部位 53.865 mg/kg、水部位 76.545 mg/kg, 剂量参考笔者前期预实验和文献[15]设置。大鼠灌胃体积为 20 mL/kg。

2.4 观察指标和检测方法

实验期间, 观察大鼠的一般情况, 包括精神状态、活动情况、毛色变化、饮食量、饮水量等, 并每隔 2 天称定大鼠体质量, 测量其肛温。于第 14 天给药后, 每组随机取 6 只大鼠, 用代谢笼收集 24 h 尿液, 留尿期间动物不摄食, 自由饮水。将代谢笼集尿器置于冰上, 加入 1% 叠氮钠溶液作为防腐剂。于第 15 天腹腔注射 3% 戊巴比妥钠溶液 (每 100 g 腹腔注射 0.1 mL) 麻醉后于腹主动脉取血, 解剖大鼠, 取双肾组织, 称其质量, 计算脏器指数, 并留取肾组织作病理学检查。每组余下的 6 只大鼠, 于第 15 天正常供给饲料与水, 于第 28 天同法收集 24 h 尿液, 于第 29 天同法取血、取双肾组织, 计算脏器指数, 并留取肾组织作病理学检查。

收集的尿液以 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液

于 -20 °C 保存, 采用全自动生化分析仪分别检测尿液中 NAG、尿蛋白的水平; 留取的血样静置 40 min 后, 以 12 000 r/min 离心 15 min, 分离血清, 于 -20 °C 保存, 采用全自动生化分析仪检测血清中 NAG、BUN、Cr 的水平; 取肾 (双侧) 组织称定质量, 计算脏器指数 (脏器指数 = 脏器质量/体质量 × 100%) 后, 以 10% 中性甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋、切片, 经苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色后, 于光学显微镜下观察组织的病理变化。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件对数据进行统计分析。满足正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 大鼠一般情况变化

整个观察期, 空白组大鼠精神状态良好, 活动正常, 饮食量大, 毛发光滑, 大便正常。给药期间, 乙醇总提取物组和乙酸乙酯部位组大鼠精神比较萎靡, 活动少且卷缩成团, 饮食量减少, 大便稀薄; 停药后以上症状逐渐好转, 精神状态有明显改善, 活动量和饮食量增加, 大便趋于正常。给药期间, 石油醚部位组、正丁醇部位组和水部位组大鼠精神状态较空白组稍差, 活动量有所减少, 饮食量减少, 大便稀薄; 停药后以上症状较快好转, 精神状态有明显改善, 活动量和饮食量增加, 大便很快趋于正常。实验过程中, 空白组、水部位组、正丁醇部位组均无大鼠死亡, 乙醇总提取物组和乙酸乙酯部位组在给药第 2 周各有 3 只大鼠死亡, 石油醚部位组有 1 只大鼠死亡。

3.2 大鼠体质量、肛温变化

给药期间, 空白组大鼠体质量增长快, 乙醇总提取物组、乙酸乙酯部位组大鼠给药第 7、9、11、13 天时的体质量均较同期空白组显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 停药后, 上述组别大鼠的体质量停止下降, 逐渐增长, 但其体质量仍显著低于同期空白组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。给药期间, 石油醚部位组、正丁醇部位组、水部位组大鼠的体质量增长缓慢, 且石油醚部位组、正丁醇部位组大鼠给药第 13 天时的体质量均显著低于同期空白组 ($P < 0.05$); 停药后, 上述组别大鼠的体质量增长迅速, 但石油醚组大鼠第 15 天和正丁醇组大鼠第 15、17 天时的体质量均显著低于同期空白组 ($P < 0.05$)。实验过程中, 各组大鼠的肛温比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。了哥王不同提取物对大鼠体质量的影响见表 1。

3.3 大鼠肾脏指数变化

给药 2 周后, 与空白组比较, 乙醇总提取物组大鼠的肾脏指数显著增加 ($P < 0.05$); 乙酸乙酯部位组大鼠的肾脏指数有所降低, 石油醚部位组、正丁醇部位组、水部

表1 了哥王不同部位提取物对大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=12^a, g$)

组别	第1天	第3天	第5天	第7天	第9天	第11天	第13天	第15天	第17天	第19天	第21天	第23天	第25天	第27天
空白组	190.1±15.2	201.5±17.5	221.7±14.6	233.2±18.3	247.1±20.4	257.3±21.7	275.4±19.2	289.6±22.3	307.5±24.5	319.7±27.8	338.4±26.9	353.6±30.5	364.3±29.7	375.2±33.6
乙醇总提取物组	193.5±16.4	183.9±19.1	182.7±23.0	174.8±21.8 ^b	171.3±17.9 ^b	163.7±22.4 ^c	161.6±18.8 ^c	184.5±23.5 ^c	205.7±27.6 ^c	226.9±28.0 ^b	248.6±28.3 ^b	259.4±29.6 ^b	277.8±32.4 ^b	298.5±31.7 ^b
石油醚部位组	183.4±21.6	188.4±24.9	199.6±30.3	206.7±25.5	213.8±29.4	216.8±30.1	218.1±28.2 ^b	237.4±27.5 ^b	255.6±29.0	272.3±31.3	291.6±32.6	308.2±30.4	312.4±33.8	335.7±31.5
乙酸乙酯部位组	198.3±20.5	190.2±24.7	183.3±21.4	179.9±24.3 ^b	175.5±18.7 ^b	173.2±19.2 ^b	170.6±19.5 ^c	185.2±23.6 ^c	210.5±27.3 ^b	228.9±30.7 ^b	255.8±31.3 ^b	275.3±29.2 ^b	288.1±32.5 ^b	303.7±34.1 ^b
正丁醇部位组	189.1±16.6	187.2±18.3	185.7±19.4	186.7±17.5	194.8±23.6	202.9±28.1	198.5±29.5 ^c	210.5±26.4 ^b	234.1±27.1 ^b	258.6±30.6	286.1±31.7	311.9±27.6	330.6±33.5	345.2±32.2
水部位组	186.2±20.5	196.7±23.2	202.9±25.8	209.5±27.6	213.6±30.4	216.8±32.9	222.9±33.1	242.8±29.3	264.5±28.5	280.3±34.4	304.3±37.5	326.4±36.4	341.8±30.3	360.8±32.7

a:乙醇总提取物组和乙酸乙酯部位组大鼠在给药第2周各死亡3只,石油醚部位组大鼠死亡1只;b:与同期空白组比较, $P<0.05$;c:与同期空白组比较, $P<0.01$

位组大鼠的肾脏指数有所增加,但组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。停药恢复2周后,各给药组大鼠的肾脏指数恢复至与空白组接近,各给药组与空白组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。了哥王不同提取物对大鼠肾脏指数的影响见表2。

表2 了哥王不同部位提取物对大鼠肾脏指数的影响($\bar{x} \pm s, n=6^a, \%$)

组别	给药2周后	停药恢复2周后
空白组	0.768±0.037	0.712±0.030
乙醇总提取物组	0.843±0.065 ^b	0.745±0.042
石油醚部位组	0.791±0.067	0.670±0.027
乙酸乙酯部位组	0.743±0.015	0.740±0.054
正丁醇部位组	0.783±0.047	0.700±0.071
水部位组	0.791±0.061	0.708±0.061

a:乙醇总提取物组和乙酸乙酯部位组大鼠在给药第2周各死亡3只,石油醚部位组死亡1只;b:与空白组比较, $P<0.05$

3.4 大鼠血清中NAG、BUN、Cr水平变化

给药2周后,与空白组比较,乙醇总提取物组、乙酸乙酯部位组大鼠血清中NAG、BUN、Cr水平,正丁醇部位组大鼠血清中NAG水平和水部位组大鼠血清中Cr水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。停药恢复2周后,各给药组大鼠血清中NAG、BUN、Cr水平均恢复至与空白组接近,各给药组与空白组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。了哥王不同提取物对大鼠血清中NAG、BUN、Cr水平的影响见表3。

表3 了哥王不同部位提取物对大鼠血清中NAG、BUN、Cr水平的影响($\bar{x} \pm s, n=6^a$)

组别	给药2周后			停药恢复2周后		
	NAG/(U/L)	BUN/(mmol/L)	Cr/(μ mol/L)	NAG/(U/L)	BUN/(mmol/L)	Cr/(μ mol/L)
空白组	43.83±4.75	5.92±1.12	27.72±1.89	47.50±4.94	6.96±0.94	27.25±0.78
乙醇总提取物组	57.17±6.37 ^b	7.63±1.13 ^c	30.53±1.70 ^c	51.50±2.12	5.80±0.12	28.80±7.21
石油醚部位组	48.33±6.38	6.72±1.11	28.37±3.53	53.50±3.02	6.89±0.95	28.15±3.94
乙酸乙酯部位组	54.50±5.07 ^b	7.48±0.51 ^c	32.53±2.53 ^c	44.33±4.27	6.50±1.07	29.72±4.28
正丁醇部位组	55.33±7.06 ^b	6.97±1.06	30.43±3.97	49.50±6.36	6.51±0.58	27.45±3.32
水部位组	50.83±8.03	7.30±1.26	29.83±2.85 ^c	47.50±4.94	6.96±0.94	27.25±0.78

a:乙醇总提取物组和乙酸乙酯部位组大鼠在给药第2周各死亡3只,石油醚部位组死亡1只;b:与空白组比较, $P<0.01$;c:与空白组比较, $P<0.05$

3.5 大鼠尿液中NAG、尿蛋白水平变化

给药2周后,与空白组比较,乙醇总提取物组、石油

醚部位组大鼠尿液中NAG水平和乙酸乙酯部位组大鼠尿液中NAG、尿蛋白水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。停药恢复2周后,各给药组大鼠尿液中NAG、尿蛋白水平均恢复至与空白组接近,各给药组与空白组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。了哥王不同提取物对大鼠尿液中NAG、尿蛋白水平的影响见表4。

表4 了哥王不同部位提取物对大鼠尿液中NAG、尿蛋白水平的影响($\bar{x} \pm s, n=6^a$)

组别	给药2周后		停药恢复2周后	
	NAG/(U/L)	尿蛋白/(g/L)	NAG/(U/L)	尿蛋白/(g/L)
空白组	1.00±0.02	0.18±0.04	1.15±0.03	0.19±0.03
乙醇总提取物组	10.25±0.83 ^b	0.23±0.13	1.45±0.12	0.33±0.20
石油醚部位组	23.50±3.51 ^b	0.22±0.12	1.30±0.11	0.24±0.15
乙酸乙酯部位组	10.50±2.56 ^c	0.42±0.05 ^c	1.25±0.06	0.32±0.07
正丁醇部位组	2.20±1.09	0.31±0.29	1.12±0.09	0.30±0.11
水部位组	1.00±0.03	0.11±0.02	1.00±0.05	0.17±0.04

a:乙醇总提取物组和乙酸乙酯部位组大鼠在给药第2周各死亡3只,石油醚部位组大鼠死亡1只;b:与空白组比较, $P<0.01$;c:与空白组比较, $P<0.05$

3.6 大鼠肾组织病理形态学变化

给药2周后,空白组大鼠的肾小球内未见细胞增生、出血、纤维化,肾小管未见扩张、萎缩、变性、坏死,间质未见水肿、出血、炎症细胞浸润,肾盂黏膜未见细胞坏死、脱落、炎症细胞浸润;乙醇总提取物组大鼠的肾小管结构不清,细胞肿胀,少数细胞坏死,伴有肾小球固缩;石油醚部位组大鼠的肾小管结构不清,上皮细胞溶解、坏死,伴有肾小球固缩、肾小管硬化;乙酸乙酯部位组大鼠的肾小管上皮细胞肿胀脱落,肾小球结构不清,细胞肿胀,少数细胞坏死,血管扩张,炎症细胞浸润;正丁醇部位组大鼠的肾小管结构清晰,未见变性、坏死,少见水肿和炎症细胞浸润;水部位组大鼠的肾小管结构清晰,未见变性、坏死、水肿、出血、炎症细胞浸润、纤维化。停药恢复2周后,各给药组大鼠的肾小球结构逐渐恢复,乙醇总提取物组、石油醚部位组、乙酸乙酯部位组大鼠肾组织少见细胞肿胀和炎症细胞浸润,未见细胞坏死、肾小球固缩、肾小管硬化;正丁醇部位组和水部位组大鼠的肾小管结构清晰,未见变性、坏死、水肿、出血。了哥王不同提取物对大鼠肾组织形态学影响的显微图见图1。

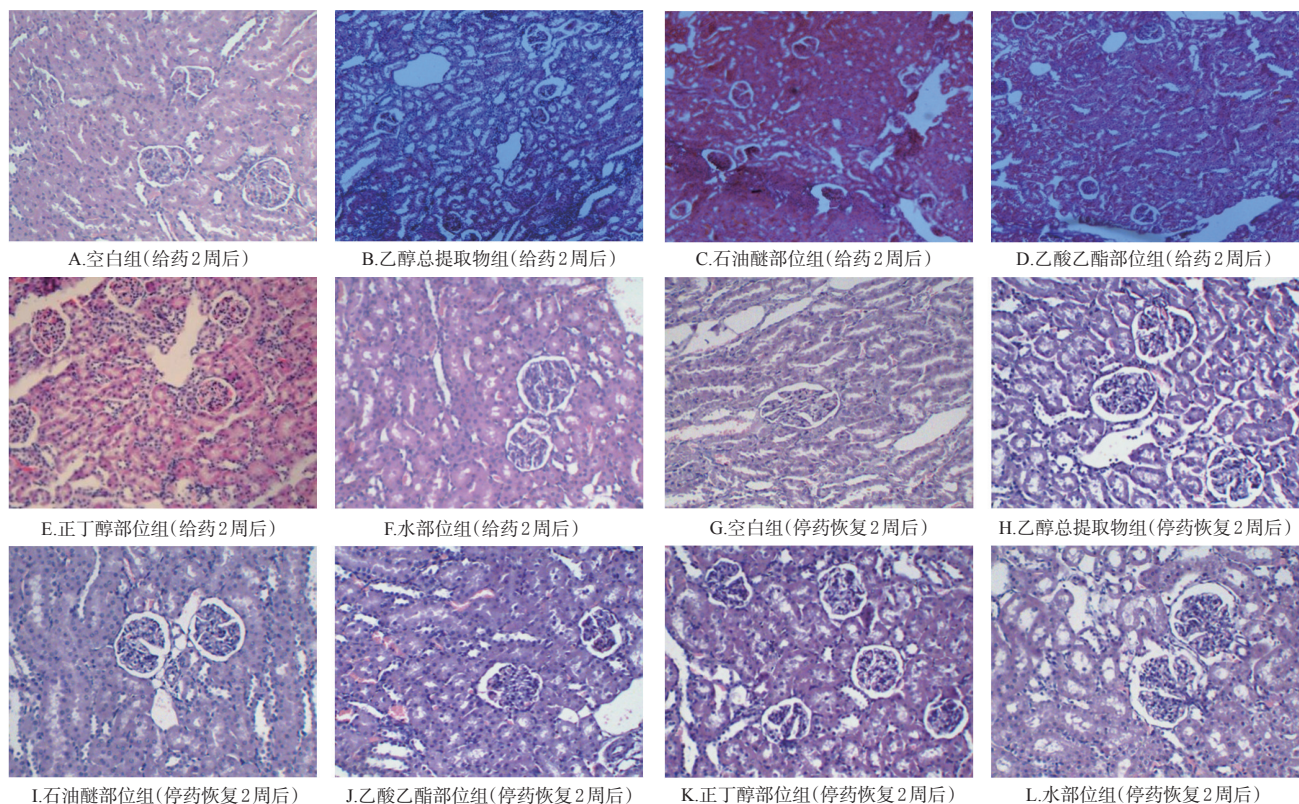


图1 了哥王不同部位提取物对大鼠肾组织形态学影响的显微图(HE染色,×200)

4 讨论

NAG广泛分布在哺乳动物各组织中,为人类泌尿系统所特有的酶。目前,尿液中的NAG检测已被作为观察肾损伤的首选指标,尤其是用于环境肾毒性物质的研究^[17-19]。BUN和Cr作为反映肾功能的指标,在临床上应用广泛。BUN和Cr同时检测更有意义,如二者同时升高,说明肾损伤严重^[20-22]。另外,尿蛋白也是肾脏疾病诊断和疗效评价的重要指标,尤其是中、低分子量的尿蛋白与肾损伤的早期诊断、治疗和患者预后密切相关^[23-24]。

本研究主要考察苗药了哥王不同部位提取物对健康大鼠的肾毒性,结果表明,给药2周后,苗药了哥王乙醇总提取物、乙酸乙酯部位可使大鼠出现精神萎靡、活动量和饮食量减少、大便稀薄、体质量下降等中毒行为活动特征;仅乙醇总提取物组大鼠的肾脏指数升高,且差异有统计学意义($P<0.05$);乙醇总提取物组和乙酸乙酯组大鼠血清中NAG、BUN和Cr水平均明显升高,乙醇总提取物组、石油醚部位组、乙酸乙酯部位组大鼠尿液中NAG水平和乙酸乙酯部位组尿蛋白水平均明显升高,且与空白组比较差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);而正丁醇部位、水部位对大鼠上述指标的影响较小。在病理形态学观察中,乙醇总提取物组、石油醚部位组、乙酸乙酯部位组大鼠均可见肾小管结构不清、上皮细胞溶解和坏死、肾小球固缩、肾小管硬化、细胞肿胀、少数细胞坏死、血管扩张、炎症细胞浸润等肾组织病理损伤情况,但严重程度不一;正丁醇部位组、水部

位组大鼠肾小管结构清晰,未见变性、坏死,未见或少数水肿、出血、炎症细胞浸润、纤维化等肾组织病理改变。停药恢复2周后,各组大鼠血清和尿液中上述肾功能相关指标水平均恢复至与空白组接近,肾组织的病理损伤也明显减轻,基本恢复正常。

综上所述,苗药了哥王乙醇总提取物、石油醚部位、乙酸乙酯部位均具有一定的肾毒性,可对大鼠肾组织造成一定损伤;停药一定时间后,大鼠肾损伤有所减轻,具有一定的可逆性。了哥王毒性成分主要存在于乙酸乙酯及石油醚部位,推测毒性成分为脂溶性成分,但其具体成分及毒性机制还有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 浙江植物志编辑委员会. 浙江植物志:第四卷[M].杭州:浙江科学技术出版社,1999:255-256.
- [2] SHAO M, HUANG X J, LIU J S, et al. A new cytotoxic biflavonoid from the rhizome of *Wikstroemia indica*[J]. Nat Prod Res, 2016, 30(12): 1417-1422.
- [3] HUANG W H, ZHOU G X, WANG G C, et al. A new biflavonoid with antiviral activity from the roots of *Wikstroemia indica*[J]. J Asian Nat Prod Res, 2012, 14(4): 401-406.
- [4] 张金娟,熊英,李玮,等.了哥王炮制前后的药效比较研究[J].时珍国医国药,2015,26(5):1118-1120.
- [5] 邵萌,黄晓君,孙学刚,等.了哥王根茎中的酚性成分及其抗肿瘤活性研究[J].天然产物研究与开发,2014,26(6): 851-855,875.

- [6] 颜红,夏新华,王挥,等.西瑞香素对人肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响[J].湖南中医药大学学报, 2013,33(9):41-43,81.
- [7] LU C L, ZHU L, PIAO J H, et al. Chemical compositions extracted from *Wikstroemia indica* and their multiple activities[J]. *Pharm Biol*, 2012, 50(2):225-231.
- [8] 姜洪芳,白雪,牛慧彦,等.西瑞香素对肺癌 A549 细胞侵袭及迁移能力的影响[J].实用药物与临床, 2016, 19(2): 131-135.
- [9] WANG L Y, UNEHARA T, KITANAKA S. Anti-inflammatory activity of new guaiane type sesquiterpene from *Wikstroemia indica*[J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2005, 53(1):137-139.
- [10] 张金娟,熊英,张贵林,等.了哥王提取物及其不同提取部位的急性毒性研究[J].时珍国医国药, 2011, 22(11): 2829-2830.
- [11] 张金娟,熊英,李玮,等.了哥王生品及2种炮制品的急性毒性比较研究[J].中国中药杂志, 2011, 36(9): 1172-1174.
- [12] 郑传奇,冯果.了哥王化学成分及毒性研究进展[J].贵州医药, 2019, 43(10):1536-1538.
- [13] 郑传奇,冯果,李玮,等.苗药了哥王“汗渍法”炮制前后抗小鼠免疫性炎症的“量-效-毒”关系研究[J].中国药房, 2020, 31(6):661-665.
- [14] 冯果,李玮,何新,等.苗药了哥王不同炮制品乙醇提取物对小鼠的急性毒性作用比较[J].中国药房, 2017, 28(25):3536-3540.
- [15] 冯果,李玮,何新,等.苗族药了哥王不同提取物对正常大鼠肝毒性的影响[J].中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11):96-102.
- [16] FENG G, CHEN Y L, LI W, et al. Exploring the Q-marker of “sweat soaking method” processed radix *Wikstroemia indica*: based on the “effect-toxicity-chemicals” study[J]. *Phytomedicine*, 2018, 45:49-58.
- [17] D'AMICO G, BAZZI C. Urinary protein and enzyme excretion as markers of tubular damage[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2003, 12(6):639-643.
- [18] 董德平,严冲,钱开成,等.尿微量蛋白联合尿酶测定对糖尿病肾损害的临床意义[J].临床检验杂志, 2001, 19(3): 185.
- [19] 席向红,魏军,张玉蓉. NAG 活性检测在肾病诊断中的意义[J].宁夏医学杂志, 2007, 29(2):168-169.
- [20] 俞诗源,魏娉婷,郭耀,等.中药复方对麻黄素仔鼠血清 BUN、Cr 含量和肾组织的影响[J].西北师范大学学报(自然科学版), 2013, 49(6):84-90.
- [21] 刘学文,杨卫彬,荆志伟.益肾化浊颗粒对腺嘌呤饲喂法所致慢性肾衰大鼠血清中 BUN, Crea 含量的影响[J].世界中医药, 2013, 8(12):1474-1477.
- [22] 邹川,吴禹池,林启展,等.中药结肠洗液联合基础疗法对慢性肾功能衰竭患者 BUN、SCr、UA 及 IS 的影响[J].中国中西医结合杂志, 2012, 32(9):1192-1195.
- [23] 朱国文,李熙建.肾脏功能不同程度损害时尿中几种微量蛋白与尿酶变化分析[J].国际检验医学杂志, 2007, 28(6):489-491.
- [24] 万毅刚,孙伟,王婧,等.早期慢性肾脏病尿蛋白与中医证候相关性研究[J].中国中西医结合杂志, 2008, 28(9): 801-805.

(收稿日期:2021-09-08 修回日期:2021-11-14)

(编辑:舒安琴)

(上接第 412 页)

- [5] WANG C, ZHENG Q T, LU Y, et al. Dibothrioclinin I and II, epimers from *Gerbera piloselloides* (L.) Cass[J]. *Acta Crystallogr C*, 2003, 59(Pt10):O593-O595.
- [6] 肖瑛,丁怡.大丁草属植物的化学成分和药理活性研究[J].天然产物研究与开发, 2002, 14(6):51-57.
- [7] 江苏新医学院.中药大辞典:上册[M].上海:上海科学技术出版社, 1997:446.
- [8] 马韩铮,王雪峰.醒脾养儿颗粒的临床应用进展[J].中国民族民间医药, 2015, 24(22):27-28,31.
- [9] 游景瑞,熊丹丹,刘春花,等. HPLC 结合化学计量学法的毛大丁草指纹图谱研究[J].中药材, 2019, 42(1):126-130.
- [10] 游景瑞,孙佳,兰燕宇,等. UHPLC-PDA 法同时测定毛大丁草中 6 种成分[J].中成药, 2021, 43(1):111-116.
- [11] 王娜,曹葳葳,仇维华,等. RP-HPLC-UV 法同时测定毛大丁草中大丁苷和 8-甲氧基补骨脂素的含量[J].沈阳药科大学学报, 2019, 36(3):249-253.
- [12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2020 年版.北京:中国医药科技出版社, 2020:114,232,234.
- [13] 陈华林,徐俊,蔡晓洋,等.藏药奥色折布的质量标准研究[J].中国药房, 2020, 31(21):2609-2614.
- [14] 刘利琴,彭潇,马雪,等.贵州产红孩儿药材的质量标准提升研究[J].中国药房, 2020, 31(12):1458-1462.
- [15] REN W Y, QIAO Z H, WANG H W, et al. Flavonoids: promising anticancer agents[J]. *Med Res Rev*, 2003, 23(4):519-534.
- [16] 管仁伟,曲永胜,顾正位,等.木犀草苷的药理作用研究[J].中国野生植物资源, 2014, 33(1):1-3.
- [17] 郭晓民,瞿晶田,柴士伟. HPLC-DAD 法测定野菊花栓中绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷和蒙花苷[J].现代药物与临床, 2017, 32(3):382-385.

(收稿日期:2021-07-27 修回日期:2022-01-24)

(编辑:胡晓霖)