

商陆长期毒性及毒代动力学研究

孙文学, 盛云华, 黄坚, 孙杰, 王宇, 唐黎明* (上海市食品药品检验研究院药理室, 上海 201203)

摘要: 目的 通过商陆对大鼠的长期毒性以及毒代动力学的研究, 考察商陆“量-时-毒”关系。方法 连续 120 d 给大鼠灌胃低、中、高剂量商陆水提物, 观察大鼠一般状况、体质量、血生化指标、血液学指标、尿液指标及早期损伤指标, 观察主要脏器、计算脏器指数并进行病理学检查。并于 1, 28, 120 d 各组大鼠静脉取血, 用 LC-MS/MS 测定商陆皂苷甲 (esculentoside A, EsA) 血药浓度并拟合毒代动力学参数。结果 与空白对照组相比, 中、高剂量组大鼠体质量明显降低 ($P<0.05$)、情绪萎靡、活动减少, 白细胞含量显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 尿液中尿蛋白显著增高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)、肾损伤因子-1 含量显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 肾脏指数显著升高 ($P<0.05$), 组织病理学检查直接观察到肾脏出现肾小管损伤与肾间质肾炎, 大鼠出现肾脏损伤。毒代动力学研究显示, 相同剂量商陆水提物给药时, 各组大鼠血浆中 EsA 的 C_{max} 与 AUC_{0-t} 随给药时间的延长而升高; 相同给药时间点, 不同剂量组的大鼠血浆中 EsA 的 C_{max} 与 AUC_{0-t} 随剂量的升高而增加。结论 商陆重复给药 120 d 时具有明显肾毒性, EsA 是商陆毒性成分之一; 商陆的“量-时-毒”关系为给药剂量越大、给药周期越长, 大鼠血浆内 EsA 的暴露量越高, 商陆的肾毒性作用越强。

关键词: 商陆; 商陆皂苷甲; 肾毒性; “量-时-毒”关系

中图分类号: R965.3; R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2023)02-0145-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2023.02.001

引用本文: 孙文学, 盛云华, 黄坚, 等. 商陆长期毒性及毒代动力学研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(2): 145-153.

Study on Long-term Toxicity and Toxicokinetics of Phytolaccae Radix

SUN Wenxue, SHENG Yunhua, HUANG Jian, SUN Jie, WANG Yu, TANG Liming* (Institute for Pharmacology, Shanghai Institute of Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To obtain the “quantity-time-toxicity” relationship by studying the long-term toxic reaction and toxicokinetics of Phytolaccae Radix to rats. **METHODS** Rats were given low, medium and high doses of aqueous extracts of Phytolaccae Radix for 120 d to observe the general condition, body weight, blood biochemical indexes, hematological indexes, urine indexes, early injury indexes, organ indexes and pathological examinations of the rats. And on 1, 28, and 120 d, blood was collected from each group of rats, and LC-MS/MS method was used to determine the plasma concentration of esculentoside A (EsA) and fit the toxicokinetic parameters. **RESULTS** Compared with the blank control group, the rats in the middle and high-dose groups were significantly reduced in body weight ($P<0.05$), sluggish and reduced in activity, white blood cell in the blood were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), urine protein in the urine was significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), kidney injury molecule 1 increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$), kidney-to-body ratio increased significantly ($P<0.05$), histopathological examination directly observed renal tubular damage and renal interstitial nephritis in the kidneys, and kidney damage in rats. The toxicokinetic study showed that when the same dose was administered, the C_{max} and AUC_{0-t} of EsA in the plasma of each group of rats increased with the extension of the administration time. At the same time point of administration, the C_{max} and AUC_{0-t} of EsA in the plasma of rats in different doses groups increased with the increase of the dose. **CONCLUSION** Phytolaccae Radix has obvious nephrotoxicity when it is repeatedly administered for 120 d. EsA is one of the toxic components of Phytolaccae Radix. The relationship of “quantity-time-toxicity” of Phytolaccae Radix is that the greater the dose and the longer the period of administration, the higher the EsA exposure in rat plasma, the stronger the nephrotoxicity of Phytolaccae Radix.

KEYWORDS: Phytolaccae Radix; esculentoside A; nephrotoxicity; “dose-time-toxicity” relationship

商陆为商陆科植物商陆 (*Phytolacca acinosa* Roxb.) 或垂序商陆 (*Phytolacca americana* L.) 的干

燥根, 具有逐水消肿、通利二便的功效, 广泛应用于治疗痈肿疮毒、水肿胀满、二便不通等症^[1]。

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1702004)

作者简介: 孙文学, 女, 硕士 E-mail: sunwenxue_bz@163.com

*通信作者: 唐黎明, 男, 硕士, 研究员, 硕导 E-mail: dawnanyi@aliyun.com

商陆常与其他利尿中药麻黄、泽泻等组成复方制剂,如商陆麻黄汤,用于治疗水肿、急性肾小球肾炎、肝硬化腹水等疾病,有非常好的利尿作用^[2]。商陆不良反应涉及消化系统、神经系统、泌尿系统,主要症状为腹痛、呕吐、头晕、头痛、尿频、尿量多等^[3],临床上有商陆中毒案例报道^[4]。商陆中主要包括三萜皂苷类、多糖类、黄酮类、酚酸类、甾醇类等化学成分^[5-6];其中商陆皂苷甲(esculentoside A, EsA)为商陆毒性成分之一^[7],另外商陆皂苷 B(esculentoside B, EsB)、商陆皂苷 C(esculentoside C, EsC)也具有毒性作用^[8]。中国药典 2020 年版一部中,商陆仅以 EsA 的含量 $\geq 0.15\%$ 作为质量控制的标准,但不同产地、不同炮制方法对商陆中 EsA 的含量影响较大^[9-11]。本研究通过 LC-MS/MS 检测大鼠血浆内商陆毒性成分 EsA 的含量,与商陆 120 d 长期毒性结合进行相关性分析,以期获得商陆“量-时-毒”关系,为中国药典中商陆质量控制的标准提供依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠 88 只,雌雄各半,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2016-0006;动物使用许可证号:SYXK(京)2016-0011;质量合格证号:110011210107220856;饲养于 SPF 级动物房,温度为 22~24℃,湿度为 40%~70%,光照周期为 12 h(6:00~18:00 明,18:00~6:00 暗),自由采食,饮水量不限。

1.2 试剂

商陆药材饮片(上海市药材有限公司,批号:180511);血生化检测试剂(上海睿康生物科技有限公司,批号:20201001);尿液分析检测试剂(桂林优利特电子集团有限公司,批号:56208645);血液学指标分析检测试剂(批号:45344)、病理检测试剂(批号:20200908)均购自上海沪试试剂有限公司;EsA 对照品(成都麦卡希化工有限公司,批号:M90829A);人参皂苷 Rg1 对照品(上海源叶科技生物有限公司,批号:G30N10Y104330);TIM-1/KIM-1/HAVCR 酶联免疫吸附测定试剂盒(R&D Systems,批号:20200809);乌拉坦(国药集团化学试剂有限公司,批号:20201030);4%甲醛溶液(南昌雨露实验器材有限公司,批号:2020309)。

1.3 仪器

URIT-1600 全自动尿液分析仪(桂林优利特医

疗电子销售有限公司);CA510 全自动血凝分析仪(Sysmex);日立 7020 全自动血生化分析仪(HITACHI);PARA TRIMMER 修蜡仪(Thermo Scientific);HistoCore 组织包埋机(德国 Leica);ZEISS Scope.A1 光学显微镜(蔡司远东有限公司);TES2500 漂片仪(HESTION);HM 340E 型轮转切片机(德国 Microm);TEC-2602 烘片仪(HESTION);ASP6025 自动组织脱水机、ST5020 多功能染色机(德国 Leica);ROTANTA 460R 高速冷冻离心机(德国 Hettich);K30 离心机(德国 Sartorius AG);C-MAG HP10 加热板(德国 IKA);Spectra Max Plus³⁸⁴ 酶标仪(美国 Molecular Device);vortex-2 涡旋混匀器(英国 Vortex);SK1200H 超声波清洗仪(上海科导超声仪器有限公司);e2695 高效液相色谱仪(美国 Waters);API5000 LC-MS/MS 三重四级杆液质联用仪(加拿大 PerkinElmer);ACQUITY UPLC CSH C₁₈ 色谱柱(Waters)。

2 方法

2.1 剂量设置与商陆水提物的配制

中国药典 2020 年版记载商陆的人临床最大用量为 9 g·(60 kg)⁻¹(即 0.15 g·kg⁻¹),大鼠等效剂量为 0.9 g·kg⁻¹。本研究设置 3 个剂量:生药 3, 15, 30 g·kg⁻¹,分别是人临床用最大剂量的大鼠等效剂量的 3.3, 16.7, 33.3 倍。

取商陆药材饮片 1 kg,加 10 倍量纯水浸泡 90 min,于武火煮沸后,文火煎煮 1 h,趁热过滤,收集滤液。6 倍量纯水浸泡残余药渣,同法煎煮。合并 2 次滤液,然后以文火浓缩至 1 kg·(600 mL)⁻¹浸膏^[12]。浸膏保存于 4℃ 冰箱,每日根据实验动物体质量、给药体积,计算每个剂量组所需商陆浸膏的体积,取计算量浸膏与纯水,将浸膏稀释为对应浓度的商陆水提物。

商陆水提物设置 3 个剂量组,依次为生药 3, 15, 30 g·kg⁻¹,每个剂量药液浓度依次为 0.15, 0.75, 1.5 g·mL⁻¹;大鼠给药体积为 20 mL·kg⁻¹。

2.2 动物分组及给药

88 只 SD 大鼠(150±10)g 适应性饲养 1 周后,随机分为 4 组:空白对照组,商陆水提物低、中、高剂量组,每组 22 只,其中 16 只为试验组,6 只为卫星组用于毒代动力学取血,雌雄各半。空白对照组、商陆水提物低、中、高剂量组分别灌胃纯水,3, 15, 30 g·kg⁻¹ 商陆水提物,给药体积为 20 mL·kg⁻¹,每日给药 1 次,连续给药 120 d。

2.3 一般情况观察

每日观察并记录动物的毛色、行为、分泌物、排泄物、中毒情况与死亡情况等大体状况。

2.4 体质量检测

于第1次给予商陆水提物前测定动物体质量作为初始体质量,之后每周测定1次体质量,以此体质量作为该周给药量计算依据,直至实验结束。

2.5 血液生化学、血液学、尿液指标检测

2.5.1 血液生化学指标检测 每周选取一半大鼠,通过大鼠眼眶取血1 mL,4 400×g离心10 min取上清,于全自动血生化分析仪测定血清中尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、肌酐(creatinine, CR)。剩余血清冻存于-80℃超低温冰箱备用。

2.5.2 血液学指标检测 于末次给药后,腹主动脉取血,EDTA-2K抗凝,1 600×g、15 min离心,取上清,采用全自动血凝分析仪测定血液学指标,测定指标包括红细胞数(red blood cell count, RBC)、红细胞容积(red blood cell specific volume, HCT)、平均红细胞容积(mean corpuscular volume, MCV)、血红蛋白(hemoglobin, HGB)、平均红细胞血红蛋白(mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)、网织红细胞数(reticulocyte count, Retic)、白细胞数(white blood cell, WBC)、淋巴细胞数(lymphocyte, Lymph)、单核粒细胞数(monocyte, Mono)、中性粒细胞数(neutrophil, Neut)、嗜酸粒细胞数(eosinophil, EOS)、嗜碱粒细胞数(basophil, BASO)、血小板数(platelet count, PLT)。

2.5.3 尿液观察和分析 从第49天起,每周选取另一半大鼠,放置于代谢笼中收集尿液5 mL,置于全自动尿液分析仪中进行尿液外观、比重、pH值、尿糖、尿蛋白、尿胆红素、尿胆原、酮体、潜血、白细胞检查。剩余尿液冻存于-80℃超低温冰箱备用。

2.5.4 早期指标检测 采用酶联免疫吸附测定方法检测尿液中肾毒性早期指标肾损伤因子-1(kidney injury molecule 1, KIM-1)的含量。

2.6 动物处理与取材

末次给药后,大鼠置于代谢笼中,禁食不禁水18 h,收集尿液。第2天,将动物从代谢笼中拿出,称重,以25%乌拉坦腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,解剖动物,按表1取脏器,并取心脏、

表1 进行大体剖检的器官

Tab. 1 Organs for general examination

系统	器官
泌尿生殖系统	肾脏、膀胱、乳腺
神经系统	大脑、小脑、脑干、脑垂体
呼吸系统	肺脏、气管
淋巴造血系统	淋巴结、胸腺、脾脏
内分泌系统	肾上腺、甲状腺、甲状旁腺、唾液腺
循环系统	主动脉、心脏

脑、肝脏、肾脏、脾脏、肺脏、脾脏、肾上腺称重,计算脏器指数(脏器指数=脏器质量/体质量×100%)和脏脑比系数(脏脑比=脏器重量/脑重×100%)。将除大脑、小脑、脑干、右肾外的脏器置于4%甲醛溶液中固定备用,右肾冻存于-80℃冰箱备用。

2.7 病理学检测

对已固定左侧肾脏标本,制备石蜡切片,经苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,光学显微镜下观察肾脏组织形态学变化。

2.8 毒代动力学

2.8.1 空白血浆样本采集 取6只空白SD大鼠,腹腔注射乌拉坦麻醉,腹主动脉取血,加入EDTA-2K抗凝管中,1 600×g、15 min离心取上清得血浆,混合用作空白血浆,置于-80℃冰箱保存备用。

2.8.2 标准溶液、随行质控样品及内标溶液的配制与前处理 精密称取10 mg EsA对照品,置于10 mL量瓶中,加50%甲醇至刻度线,超声溶解,即配制为1 g·L⁻¹的EsA储备液。用50%甲醇梯度稀释该储备液配制为10, 4, 2, 1, 0.4, 0.2, 0.1 μg·mL⁻¹的标准工作溶液。质控工作溶液的配制同标准工作溶液的配制,质控工作溶液的质量浓度为8, 2, 0.2 μg·mL⁻¹。

精密称取10 mg人参皂苷Rg1对照品,置于10 mL量瓶中,加50%甲醇至刻度线,超声溶解,即配制为1 g·L⁻¹的人参皂苷Rg1储备液。用50%甲醇梯度稀释该储备液配制为10, 2, 1 μg·mL⁻¹的内标工作溶液。

标准曲线样品溶液与随行质控样品溶液的配制:取95 μL空白血浆加5 μL的标准工作溶液,配制为标准曲线样品,质量浓度依次为500, 200, 100, 50, 20, 10, 5 ng·mL⁻¹;随行质控样品溶液配制同标准曲线样品溶液的配制,质量浓度为400, 100, 10 ng·mL⁻¹。

标准曲线样品与随行质控样品的前处理：取配制好的标准曲线样品溶液与随行质控样品溶液，加入 10 μL 内标工作溶液($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)涡旋 30 s 充分混匀；加入 300 μL 乙腈，涡旋 3 min, $8\ 300\times g$, 10 min 离心 2 次，取上清，加入放内衬管的进样瓶中用于下一步分析。

双空白溶液：取 100 μL 空白血浆，加入 300 μL 乙腈后同样涡旋与离心取上清。单空白溶液：取 100 μL 空白血浆，加入 10 μL 内标工作溶液后涡旋，再加入乙腈，然后同步操作。

2.8.3 样品采集、前处理与分析 对于卫星组 SD 大鼠于第 1 天的给药前，给药后 15, 30 min, 1, 2, 4, 8, 24 h, 以及给药第 28 天、第 120 天给药后 15, 30 min, 1, 2, 4, 8 h, 采集血浆样品置于 -80°C 冰箱保存待测。检测时，取解冻的待测血浆样品 100 μL , 加入 10 μL 内标工作溶液($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 涡旋 30 s 充分混匀；加入 300 μL 乙腈，涡旋 3 min, $8\ 000\times g$, 10 min 离心 2 次，取上清，加入放内衬管的进样瓶中用于分析。

2.8.4 液质分析条件 色谱分析条件：采用 Waters ACQUITY UPLC CSH C_{18} 色谱柱 ($3.0\ \text{mm}\times 100\ \text{mm}$, $1.7\ \mu\text{m}$)；流动相 0.1% 甲酸溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~1 min, 90%A; 1~3 min, 90% \rightarrow 10%A; 3~4 min, 10% \rightarrow 90%A)；流速 $0.2\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 30°C , 样品室温度 10°C , 进样量 2 μL 。

质谱分析条件：采用电喷雾离子源 (ESI), 正离子方式监测。离子源喷雾电压 (IS): 5 500 V; 温度: 400°C ; 源内气体 1 (GS1, N_2) 压力: 30 psi; 气体 2 (GS2, N_2) 压力: 45 psi; 气帘气体 (N_2) 压力: 30 psi; 碰撞气 (CAD, N_2) 压力: 30 psi; 扫描方式

为多反应监测 (MRM); 用于定量分析的离子反应分别为 $m/z\ 849.5\rightarrow 805.6$ (EsA) 和 $m/z\ 823.7\rightarrow 643.8$ (内标), 去簇电压 (DP) 为 100 V, 射入电压 (EP) 为 8 V, 碰撞能量 (CE) 分别为 67 eV, 碰撞室射出电压 (CXP) 为 $33\ \text{V}^{[13-14]}$ 。

2.9 数据分析

应用 SPSS 20.0、SAS9.4、GraphPad Prism 8.01 和 DAS2.1.1 软件进行数据分析。体质量、脏器重量、脏器系数、血生化指标的各项数据，均用 $\bar{x}\pm s$ 表示。首先进行 Levene's 检验，当 $P>0.05$, 采用单因素 ANOVA 进行检验；当 $P\leq 0.05$, 采用 Kruskal-wallis 检验。尿蛋白指标采用 Kruskal-Wallis 检验的 Dwass-Steel-Critchlow-Fligner 比较。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。药动学项下成批数据分析，计算各组药动学参数，绘制药时曲线。

3 结果

3.1 一般情况观察

与空白对照组相比，商陆水提取物低剂量组大鼠皮毛颜色正常、活动状态与精神状态正常、饮食正常；商陆水提取物中剂量组皮毛发黄、黯淡无光，活动减少、常趴伏不动，精神状态萎靡；高剂量组大鼠不健康状态相比较于中剂量组明显加强，皮毛粗糙黯淡，精神萎靡但攻击性增强，个别高剂量大鼠体质量明显减轻、后期体质量有恢复，个别大鼠尿液呈现棕褐色。

3.2 体质量

与空白对照组相比，中剂量组雄性大鼠自第 21 天起持续至第 120 天体质量明显降低 ($P<0.05$)；高剂量组雄性大鼠从第 28 天至第 98 天，除第 56 天外，体质量明显降低 ($P<0.05$)，具体结果见图 1。

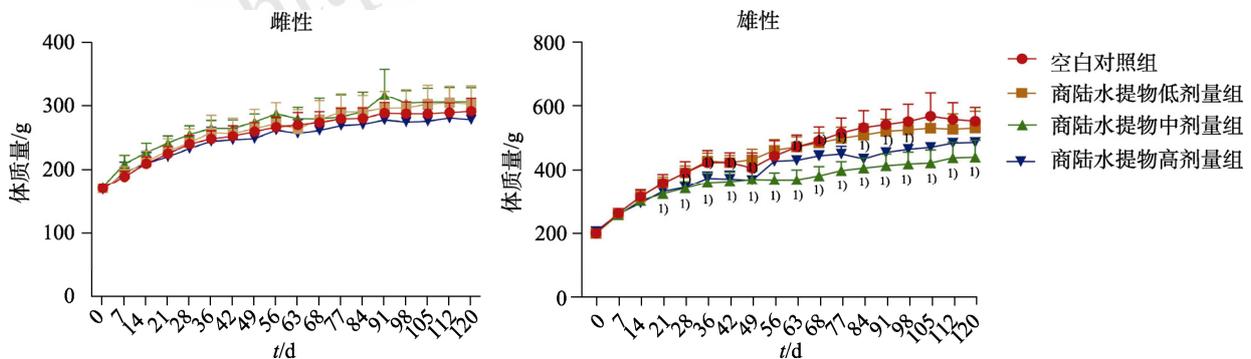


图 1 大鼠体质量变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

与空白对照组相比, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 1 Rat body weight changes ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Compared with blank control group, $^{1)}P<0.05$.

各组雌性大鼠体质量无明显改变。

3.3 脏器指数

与空白对照组相比，中剂量组雌性大鼠的肾脏指数显著升高($P<0.05$)，高剂量组雄性大鼠的肾脏指数显著升高($P<0.05$)，具体结果见图 2。肾脑比、肝脑比与肝体比未出现显著性差异。

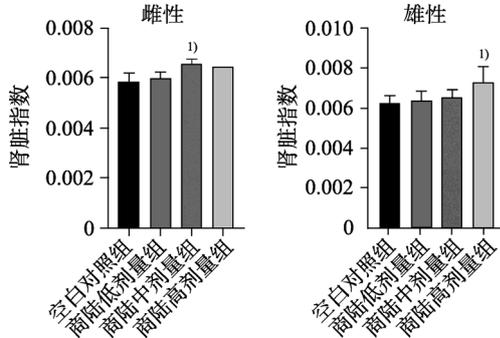


图 2 大鼠肾脏指数($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

与空白对照组相比, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig 2 Kidney-to-body ratio of rats($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Compared with blank control group, $^{1)}P<0.05$ 。

3.4 血液生化学指标检测

肾脏损伤血生化指标 BUN 每周检测结果显示，与空白对照组相比，商陆低剂量组第 36 天起至第 63 天，除第 42 天外，大鼠血清中 BUN 水平均出现显著性降低($P<0.05$)，高剂量组第 36 天出现 BUN 水平的显著性降低($P<0.01$)以及第 98 天出现 BUN 水平的显著性升高($P<0.05$)，具体结果见图 3。肾脏损伤血生化指标 CR 每周检测结果显示，与空白对照组相比，商陆各剂量组 CR 水平未出现显著性改变。

3.5 血液学指标检测

120 d 给药结束后的血液学检测指标结果显示，RBC、HGB、HCT、MCV、MCH、MCHC、PLT、Neut、Eos、Retic 均未显示组间差异；WBC 水平，与空白对照组相比，商陆中剂量组出现显著性升高($P<0.01$)，商陆高剂量组明显增高($P<0.05$)；淋巴细胞数 Lymph 水平，与空白对照组相比，商

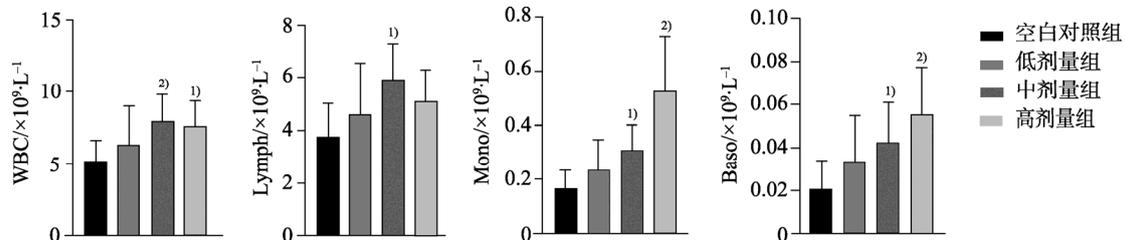


图 4 大鼠血液学检测指标($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

与空白对照组相比, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$ 。

Fig. 4 Rat hematology test index results($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Compared with blank control group, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$ 。

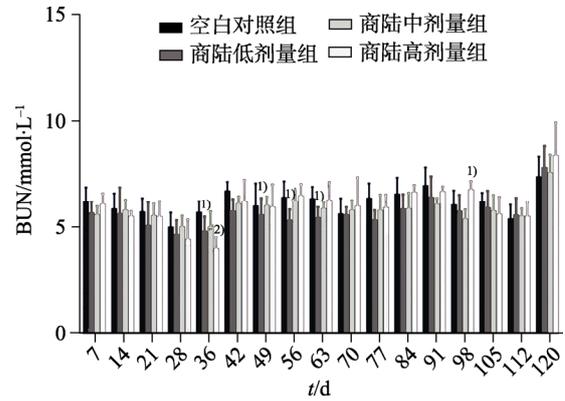


图 3 大鼠血液生化学检测指标 BUN($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

与空白对照组相比, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$ 。

Fig. 3 Rat blood biochemical detection index BUN($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Compared with blank control group, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$ 。

陆中剂量组出现显著性升高($P<0.05$)；Mono 水平，与空白对照组相比，商陆中剂量组水平有明显的提高($P<0.05$)，商陆高剂量组水平显著性提升($P<0.01$)；Baso 水平，与空白对照组相比，商陆中剂量组水平有明显的提高($P<0.05$)，商陆高剂量组水平显著性提升($P<0.01$)。各组血液学指标统计结果见图 4。

3.6 尿液指标检测

对每周的尿液进行尿液外观、比重、pH 值、尿糖、尿蛋白、尿胆红素、尿胆原、酮体、潜血、白细胞的检测并统计后，仅发现尿蛋白出现了组间差异。正常大鼠尿液中不能探测到尿蛋白，尿蛋白数值为 0，当肾脏出现损伤时尿液中检测到尿蛋白，尿蛋白值为 0.15, 0.3, 1，尿蛋白值越大代表肾脏损伤越严重。采用 Kruskal-Wallis 检验的 Dwass-Steel Critchlow-Fligner 方法将各剂量组与空白对照组进行比较，第 49 天至第 112 天中剂量组数值与空白对照组比较存在显著性差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，第 56 天至第 120 天高剂量组与空白对照组相比存在显著性差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。具体统计结果见表 2。

表 2 Dwass-Steel Critchlow-Fligner 法大鼠尿蛋白各组 P 值($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Tab. 2 Dwass-Steel Critchlow-Fligner method rat urine protein P value of each group($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	49 d	56 d	63 d	70 d	84 d	91 d	98 d	112 d	120 d
空白对照组	/	/	/	/	/	/	/	/	/
商陆低剂量组	0.749 4	1	/	0.749 4	0.749 4	1	0.749 4	0.999 7	1
商陆中剂量组	0.015 9 ¹⁾	0.005 9 ²⁾	0.000 6 ²⁾	0.044 7 ¹⁾	0.020 3 ¹⁾	0.005 7 ²⁾	0.001 6 ²⁾	0.018 4 ¹⁾	0.749 4
商陆高剂量组	0.051 2	0.001 2 ²⁾	0.000 8 ²⁾	0.001 7 ²⁾	0.003 4 ²⁾	0.001 5 ²⁾	0.001 5 ²⁾	0.009 6 ²⁾	0.006 2 ²⁾

注: 与空白对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with blank control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

3.7 早期指标检测 KIM-1 含量检测

尿液中 KIM-1 水平检测结果显示, 与空白对照组相比, 商陆中剂量组第 28 天、第 91 天、第 105 天、第 112 天均出现显著性升高($P<0.05$, $P<0.01$); 商陆高剂量组在第 7 天出现升高趋势, 从第 14 天起至第 120 天(除第 68 天与 112 天个别大鼠的个体差异影响外)均显著性升高($P<0.01$)。每周各组大鼠的 KIM-1 检测情况见图 5。

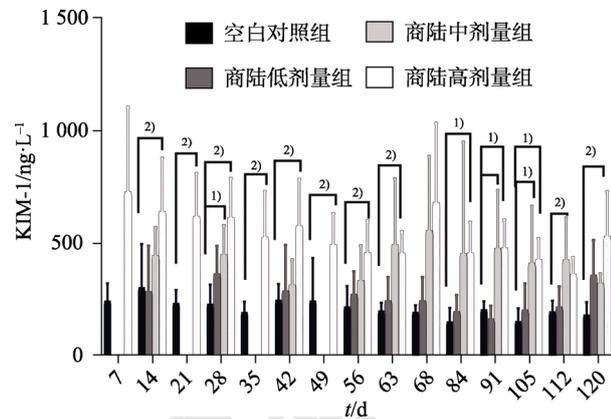


图 5 大鼠尿液早期指标 KIM-1($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

与空白对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 5 Results of KIM-1, an early indicator of urine in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Compared with blank control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

3.8 肾脏组织病理学 HE 染色

与空白对照组相比, 商陆水提取物低剂量组大鼠肾脏组织未见明显异常, 商陆水提取物中剂量组大鼠肾脏组织见肾小管局灶性萎缩、肾间质肾炎(炎症细胞浸润, 淋巴细胞为主), 商陆水提取物高剂量组大鼠肾脏组织见肾小管局部坏死、肾间质肾炎(炎症细胞浸润, 淋巴细胞为主)、局部肾小管萎缩。具体结果见图 6 与表 3。

3.9 毒代动力学实验

3.9.1 标准曲线、回归方程与相关系数 基于 LC-MS/MS 的商陆指标成分的生物分析的标准曲线方程为 $y=0.013 1x+0.018 9$, 相关系数 $r=0.999 1$ 。

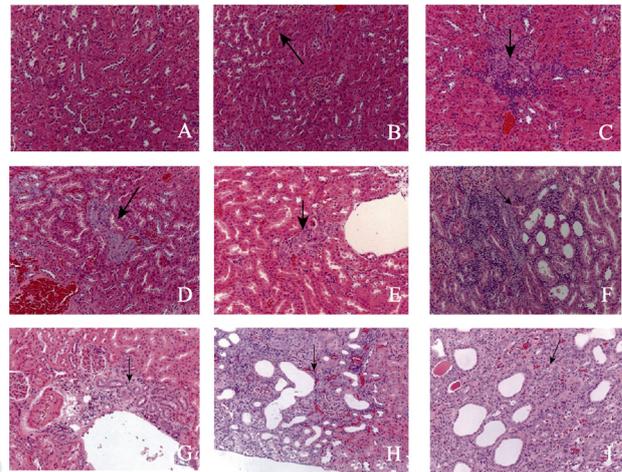


图 6 大鼠肾脏的组织病理学检查(HE, 200 \times)

A-空白对照组, 肾脏未见明显异常; B-商陆低剂量组, 肾脏未见明显异常; C、D-商陆中剂量组, 肾小管局灶性萎缩, 肾间质肾炎(炎症细胞浸润, 淋巴细胞为主); E-商陆高剂量组, 肾小管局部坏死, 炎症细胞浸润, 以中性粒细胞为主; F、G、H、I-商陆高剂量组, 肾小管局灶性萎缩, 肾间质肾炎(炎症细胞浸润, 淋巴细胞为主)。

Fig. 6 Histopathological examination of rat kidney(HE, 200 \times)

A-blank control group, there was no obvious abnormality in the kidney; B-Phytolaccae Radix low-dose group, there was no obvious abnormality in the kidney; C, D-Phytolaccae Radix middle dose group, focal atrophy of renal tubules, renal interstitial nephritis(inflammatory cell infiltration, mainly lymphocytes); E-Phytolaccae Radix high-dose group, local necrosis of renal tubules, inflammatory cell infiltration, mainly neutrophils; F, G, H, I-Phytolaccae Radix high-dose group, kidney focal tubule atrophy, renal interstitial nephritis(infiltration of inflammatory cells, mainly lymphocytes).

表 3 商陆致大鼠肾脏病理损伤程度分级(HE)

Tab. 3 Grading of kidney pathological damage in rats(HE)

组别	检测动物数/组别总动物数	只				
		-	±	+	++	+++
空白对照组	8/16	8	0	0	0	0
低剂量组	8/16	8	0	0	0	0
中剂量组	8/16	5	1	2	0	0
高剂量组	8/16	2	1	1	4	0

3.9.2 典型色谱图 基于 LC-MS/MS 的商陆指标成分的生物分析的典型色谱图见图 7。

3.9.3 毒代动力学参数 商陆低剂量组 1, 28, 120 d 的曲线下面积 AUC_{0-t} 分别为(35.70 \pm 35.29),

(77.62±19.20), (169.25±9.89)h·ng·mL⁻¹; 商陆中剂量组 1, 28, 120 d 的 AUC_{0-t} 分别为(398.47±202.18), (983.71±738.59), (1 125.26±443.74)h·ng·mL⁻¹; 商陆高剂量组 1, 28, 120 d 的 AUC_{0-t} 分别为(913.08±153.70), (1 551.40±399.38), (1 744.60±985.01)h·ng·mL⁻¹。商陆低剂量组 1, 28, 120 d 的达峰浓度 C_{max} 分别为(7.49±5.50), (13.81±4.36), (21.86±11.41) ng·mL⁻¹; 商陆中剂量组 1, 28, 120 d 的 C_{max} 分别为(84.58±90.46), (89.02±68.04), (213.7±162.45) ng·mL⁻¹; 商陆高剂量组 1, 28, 120 d 的 C_{max} 分别为(92.33±40.55), (285.45±

152.39), (438.95±427.02) ng·mL⁻¹。第 1, 28, 120 天的各组大鼠血浆中商陆皂苷甲的毒代动力学参数见表 4。

3.9.4 毒-时曲线 商陆低、中、高剂量组的给药 1, 28, 120 d 时 SD 大鼠血浆内商陆皂苷甲的毒-时曲线见图 8~10。由图可见, 不同剂量组、不同时间点的毒-时曲线较为相似, EsA 在体内吸收速度极快, 达峰时间在 1 h 左右。

4 讨论

中国药典 2020 年版记载商陆的临床用量为 3~9 g·(60 kg)⁻¹(即 0.05~0.15 g·kg⁻¹), 大鼠等

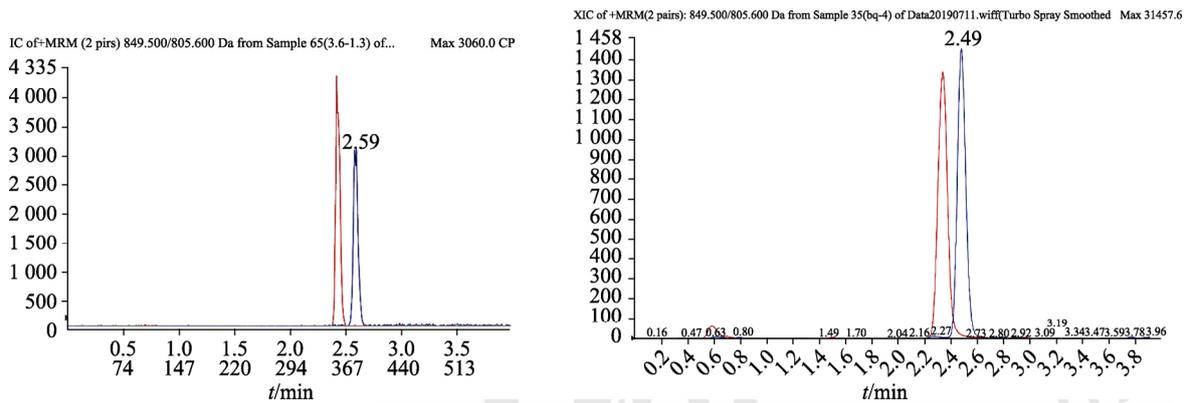


图 7 基于 LC-MS/MS 的商陆指标成分的生物分析的典型色谱图

Fig. 7 Typical chromatogram of biological analysis of index components based on LC-MS/MS

表 4 给药后大鼠血浆中商陆皂苷甲的毒代动力学参数-时间-剂量关系($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 4 Toxicokinetic parameters of EsA in rat plasma after administration-time-dose relationship($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

t/d	剂量/g·kg ⁻¹	C _{max} /ng·mL ⁻¹	T _{max} /h	t _{1/2z} /h	AUC _{0-t} /h·ng·mL ⁻¹
1	3	7.49±5.50	1.38±1.43	5.36±4.16	35.70±35.29
	15	84.58±90.46	0.75±0.71	10.52±9.11	398.47±202.18
	30	92.33±40.55	1.67±2.02	15.59±3.95	913.08±153.70
28	3	13.81±4.36	0.94±0.78	17.13±24.30	77.62±19.20
	15	89.02±68.04	0.38±0.14	17.82±4.52	983.71±738.59
	30	285.45±152.39	1.00±1.50	22.48±33.00	1 551.40±399.38
120	3	21.86±11.41	2.31±3.79	15.07±5.73	169.25±9.89
	15	213.70±162.45	0.25±0	9.67±6.04	1 125.26±443.74
	30	438.95±427.02	0.50±0.27	4.33±2.09	1 744.60±985.01

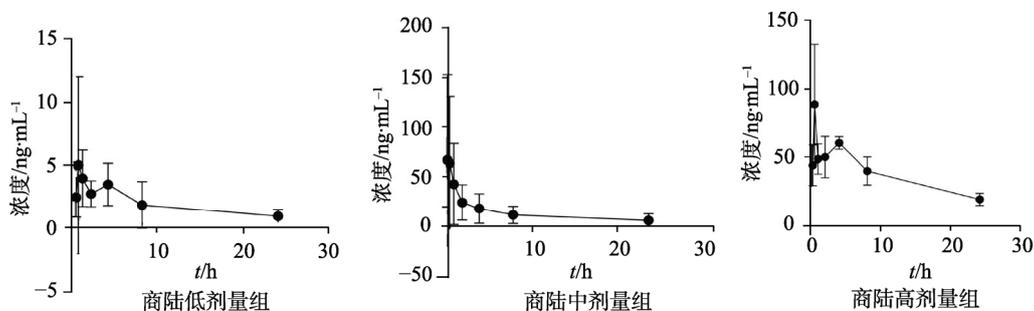


图 8 给药第 1 天的毒-时曲线

Fig. 8 Toxicity-time curve on the 1st day of administration

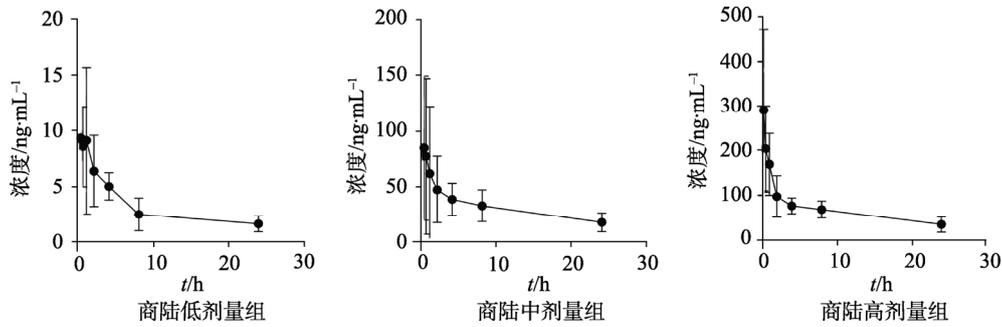


图9 给药第28天的毒-时曲线
Fig. 9 Toxicity-time curve on the 28th day of administration

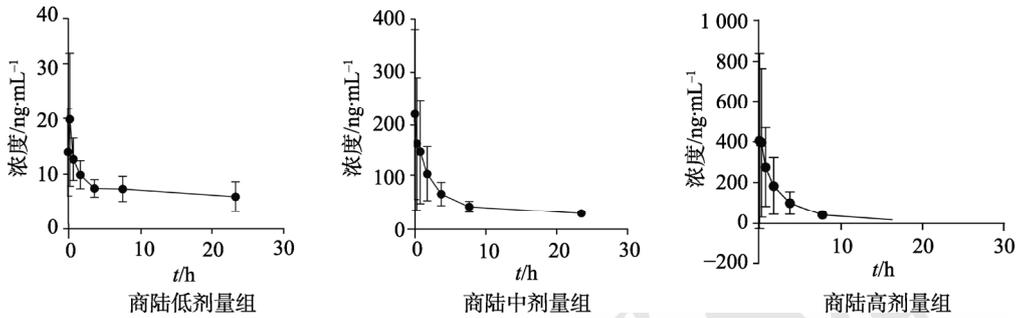


图10 给药第120天的毒-时曲线
Fig. 10 Toxicity-time curve on the 120th day of administration

效剂量为 $0.3\sim 0.9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。商陆重复给药毒性研究中,设置了3个剂量,分别为生药 $3, 15, 30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;其中生药 $3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 介于商陆的药效剂量 $0.9\sim 3.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 为商陆的药效剂量,临床用剂量的大鼠等效剂量的3.3倍左右; $30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 为根据本课题组做的急性毒性试验得出的大鼠最大耐受量(生药 $31.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)的近似值,人用剂量的大鼠等效剂量的33.3倍;生药 $15\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 则取其二者的中间剂量,是人用剂量的大鼠等效剂量的16.7倍。研究结果显示, $15, 30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 商陆水提物重复给药120d后会造成大鼠肾脏损伤;文献报道商陆肾毒性剂量为生药 $10, 20, 40\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 本课题研究结果显示的商陆肾毒性剂量与文献中商陆肾毒性剂量一致。

BUN与CR是评价肾脏功能的主要指标,当肾脏功能受损时,血清BUN、CR会明显升高。文献报道,长期重复灌胃生药 $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的商陆水提物,第35天出现CR水平的显著性升高($P<0.05$),第49天出现BUN水平的显著性升高($P<0.05$)以及肾小管间质纤维化^[15];长期重复灌胃 $20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的商陆水提物,第21天出现BUN水平的显著性升高($P<0.05$),第35天出现CR水平的显著性升高($P<0.01$)以及肾小管间质纤维化的病理改变,第49天出现蛋白管型的病理改变^[15]。而本研究,与空

白对照组相比,商陆低剂量组第36天起至第63天,除第42天外,大鼠血清中BUN水平出现显著性降低($P<0.05$),高剂量组第36天出现BUN水平的显著性降低($P<0.01$)以及第98天出现BUN水平的显著性升高($P<0.05$),商陆各剂量组CR水平未出现显著性改变。对BUN的降低,也有文献报道了相同现象^[15],目前还不能解释原因,需要进一步探索与研究。

血液学检测结果显示,中、高剂量组大鼠血液内多种白细胞数量显著性升高,提示大鼠体内出现炎症或者组织损伤等病症。

当肾脏出现损伤,肾小球的滤过功能受损或肾小管与集合管的重吸收功能受损,尿液中蛋白含量会出现升高的现象。尿液检测结果显示从第49天起,中、高剂量组大鼠尿液中出现尿蛋白,这表明肾脏出现了损伤,且随时间与剂量的升高呈现增高趋势^[16]。

KIM-1在正常肝、肾、脾微量表达,而在受损后再生的近曲小管上皮细胞中表达显著增强,因此检测尿液中KIM-1水平可间接评价肾小管损伤情况。商陆中、高剂量组尿液中均出现了KIM-1浓度的显著性升高,提示了不同程度的肾小管损伤的发生,尤其高剂量组在第14天就出现了

KIM-1 浓度的显著升高,能够早于血生化指标变化提示肾损伤的发生。

肾脏指数出现显著性升高,但肾脏重量没有显著性差异、大鼠体质量显著性降低、肾脑比没有显著性差异。

肾脏组织切片通过 HE 染色观察到了中、高剂量组大鼠不同程度的肾脏损伤,高剂量组损伤明显重于中剂量组,呈现剂量依赖趋势。

因此,综合尿液中尿蛋白指标、血液学指标以及组织病理学观察,确认中、高剂量组的大鼠连续 120 d 给药后出现了肾脏损伤,商陆水提物有一定的肾毒性。

5 结论

生药 15 g·kg⁻¹ 与生药 30 g·kg⁻¹ 商陆水提物长期重复给药后会导致大鼠出现肾脏损伤;商陆的“量-时-毒”关系为,给药剂量越大、给药周期越长,大鼠血浆内 EsA 的暴露量越高,商陆的肾毒性作用越强。

REFERENCES

[1] 中国药典. 一部[S]. 2020: 324.

[2] SUN W X, SHENG Y H, HUANG J, et al. Research on diuretic activity and nephrotoxicity of Radix Phytolaccae[J]. World Chin Med(世界中医药), 2020, 15(23): 3586-3592.

[3] LI Y F, YAO G T. Review on pharmacological effects and toxicity of phytolaccae[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(13): 248-251.

[4] 贾丽君, 郭燕, 侯云生. 商陆中毒二例分析[J]. 临床误诊误治, 2016, 29(4): 115-116.

[5] HUANG H W, LIU C X, YAN C Y, et al. Chemical constituents and pharmacological effects of Phytolaccae Radix and prediction of quality markers: Research advances[J]. J Int Pharm Res(国际药学研究杂志), 2020, 47(3): 188-198.

[6] MA J, CHEN Q L, LAI D W, et al. Separation and purification of triterpene saponins from roots of Radix Phytolaccae by high-speed countercurrent chromatography coupled with evaporative light scattering detection[J]. J Liq Chromatogr

Relat Technol, 2010, 33(4): 563-571.

- [7] ZHOU Q, YAO G T, JIN R M, et al. Study on renal cell toxicity induced by esculentoside A[J]. World Chin Med(世界中医药), 2014, 9(2): 151-154.
- [8] YU H L, GONG L, WANG X Z, et al. Rabbit conjunctivae edema and release of NO, TNF- α , and IL-1 β from macrophages induced by fractions and esculentosides isolated from *Phytolacca americana*[J]. Pharm Biol, 2016, 54(1): 98-104.
- [9] PEI L X, JI B Y, CHEN S Q, et al. Quality of Phytolaccae Radix from different sources in Henan[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2017, 23(2): 48-52.
- [10] QIU M M. Research on the integrated process of original processing and processing of Phytolacca Radix[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2018.
- [11] YU H L, ZHANG C C, WU H, et al. Effect of vinegar processing on esculentosides in n-BuOH fraction and main toxic components in Phytolaccae Radix[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2017, 42(1): 125-129.
- [12] XU T T, LI Y F, JIN R M, et al. Preliminary research of Radix Phytolaccae decoction on the renal injury in rats[J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2015, 50(5): 403-407.
- [13] GUAN X D, CHANG H C, SUN F L, et al. Determination of esculentoside A in dog plasma by LC-MS/MS method: Application to pre-clinical pharmacokinetics[J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 72: 261-266.
- [14] WEI F H, SINGH R S P, FUETH M, et al. Development and validation of a HPLC-MS/MS method for the determination of phytolaccagenin in rat plasma and application to a pharmacokinetic study[J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 107: 82-88.
- [15] LI Y F, XU T T, YAO G T, et al. Characteristics of changes in urinary NGAL, KIM-1 and IL-18 in Phytolaccae Radix-induced renal injury in rats and significance of combined detection[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2012, 37(23): 3611-3617.
- [16] WANG T R, ZOU Z Y, LI J H, et al. Effects of quercetin on quantitative changes of urine volume and uric protein in rats with experimental chronic renal failure[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(1): 8-11.

收稿日期: 2022-01-12

(本文责编: 陈怡心)