

10种肾毒性中药对小鼠肾脏有机阴离子转运体的影响

孙晨^{1*}, 奇锦峰^{1#}, 余文浩¹, 王永辉², 林梅³, 张娜¹(1.广州中医药大学中药学院药理教研室, 广州 510006; 2.驻马店市人民医院药剂科, 河南驻马店 463000; 3.佛山南海中医院西药房, 广东佛山 5282000)

中图分类号 R969.1; R969.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)19-2673-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.19.25

摘要 目的:研究10种肾毒性中药对小鼠肾脏有机阴离子转运体(Oats)中3个主要亚型(Oat1、Oat2、Oat3)的影响。方法:1 840只SPF级NIH小鼠随机分为正常对照(等容纯水)组,丙磺舒(30 mg/kg)组,羧甲基纤维素钠(CMC-Na)组与白头翁、延胡索、草乌、川乌、独活、皂角刺、虎杖、甘遂、侧柏叶、木香水煎剂高、低剂量组,ig给药,bid,连续5 d。末次给药1 h后,尾iv给予对氨基马尿酸(PAH, 30 mg/kg),测定小鼠肾脏匀浆中PAH药动学参数与在1、5、10、15、20 min时间点的肾组织中PAH的蓄积量。用DAS 2.0分析软件计算血中PAH的药动学参数。分组与给药同上,末次给药1 h后制作肾切片置于PAH-buffer中,测定肾切片PAH摄取量。结果:与正常对照组比较,延胡索高剂量组,草乌高、低剂量组,独活高剂量组,虎杖高、低剂量组,侧柏叶高剂量组 $t_{1/2\beta}$ 升高;10种中药高、低剂量组 V_d 均降低;除独活低剂量组、皂角刺低剂量组、甘遂低剂量组外,其余用药组的CL均降低、 $AUC_{0-20\text{ min}}$ 均升高,差异均具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与正常对照组比较,白头翁高剂量组,延胡索高剂量组,草乌高剂量组,川乌高、低剂量组,独活高、低剂量组,皂角刺高、低剂量组,虎杖高、低剂量组,甘遂高、低剂量组,侧柏叶高、低剂量组,木香高、低剂量组小鼠肾组织PAH蓄积量增加,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与正常对照组比较,延胡索高剂量组,草乌高、低剂量组,皂角刺高、低剂量组,甘遂高剂量组,侧柏叶高、低剂量组,木香高剂量组小鼠肾切片PAH摄取量减少,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论:10种肾毒性中药可能通过抑制有机阴离子转运体Oat1、Oat2、Oat3而导致肾损伤。

关键词 肾毒性;中药;小鼠;有机阴离子转运体;对氨基马尿酸清除试验;肾切片摄取试验

Effects of 10 Kinds of Nephrotoxic TCM on Kidney Organic Anion Transporter in Mice

SUN Chen¹, QI Jin-feng¹, YU Wen-hao¹, WANG Yong-hui², LIN Mei³, ZHANG Na¹(1.Dept. of Pharmacology, College of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2.Dept. of Pharmacy, Zhumadian People's Hospital, Henan Zhumadian 463000, China; 3.Dept. of Pharmacy, Foshan Nanhai Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Foshan 528000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of 10 kinds of nephrotoxic TCM on three main subtypes (Oat1, Oat2 and Oat3) of kidney organic anion transporter (Oats) in mice. METHODS: A total of 1 840 SPF NIH mice were randomly divided into normal control group (isovolumic pure water), probenecid group (30 kg/mg), sodium carboxymethyl cellulose (CMC) group, *Pulsatillae radix*, *Corydalis rhizoma*, *Aconiti kusnezoffii radix*, *Aconiti radix*, *Angelicae pubescentis radix*, *Gleditsiae spina*, *Polygonum cuspidatum*, *Kansui radix*, *Platycladi cacumen*, *Aucklandiae radix* high and low dose groups. Mice were treated twice a day for 5 d, ig. After 1 h of the last dosing, they were iv given PAH in tail (30 mg/kg). The PAH pharmacokinetic parameters of the kidney homogenate were determined and the PAH intake in kidney tissue at the time point of 1, 5, 10, 15 and 20 min was detected. The PAH in blood was analyzed by DAS 2.0 software. The grouping and dosing were the same as before, after 1 h of the last dosing, kidney slices were made and put into PAH-buffer. The PAH intake of kidney slices was determined. RESULTS: Compared with normal control group, the $t_{1/2\beta}$ in *C. rhizoma* high dose group, *A. kusnezoffii* high and low dose groups, *A. pubescentis* high dose group, *P. cuspidatum* high and low dose groups and *P. cacumen* group were increased; V_d were all decreased in 10 kinds of TCM high and low dose groups; except for *A. pubescentis* low dose group, *G. spian* low dose group and *K. radix* low dose group, the CL was decreased and $AUC_{0-20\text{ min}}$ was increased in all other groups, with significant difference ($P<0.01$ or $P<0.05$). Compared with normal control group, the content of PAH in kidney tissue in *P. radix* high dose group, *C. rhizoma* high dose group, *A. kusnezoffii* high dose group, *A. radix* high and low dose groups, *A. pubescentis* high and low dose groups, *G. spina* high and low dose groups, *P. cuspidatum* high and low dose groups, *K. radix* high and low dose groups, *P. cacumen* high and low dose groups and *A. radix* high and low dose groups were increased, with significant difference ($P<0.01$ or $P<0.05$). Compared with normal control group, the intake of PAH in kidney slices in *C. rhizoma* high dose group, *A. kusnezoffii* high and low dose groups, *G. spina* high and low dose groups, *K. radix* high dose group, *P. cacumen* high and low dose groups and *A. radix* high dose group were decreased, with significant difference ($P<0.01$ or $P<0.05$). CONCLUSIONS: The 10 kinds of nephrotoxic TCM

* 硕士。研究方向:药动学。电话:020-39358084。E-mail: sunchen87319@163.com

通信作者:研究员,博士。研究方向:药动学。电话:020-39358084。E-mail: qjinfeng06@gzucm.edu.cn

probably induced kidney injury through inhibiting the Oat1, Oat2 and Oat3 of Oats.

KEYWORDS Nephrotoxic; Traditional Chinese medicine; Mice; Organic anion transporters; PAH clearance test; Kidney slices uptake test

肾脏在内外源性化合物及其代谢产物的消除及维持机体血压、酸碱平衡中起着关键作用。肾脏有机阴离子转运体(Organic anion transporters, OATs)介导有机阴离子型毒物、药物及其代谢产物经肾脏的转运和排泄^[1],并维护机体内环境的稳定^[2]。OAT1(SLC22A6)、OAT2(SLC22A7)、OAT3(SLC22A8)为OATs家族的主要成员,可介导有机阴离子型化合物从血液向肾小管管腔转运。研究表明,肾毒性化学物质的毒性作用常与抑制肾脏OATs有关^[3-7]。笔者从2010年版《中国药典》记载的60余种^[8]肾毒性中药中随机选取白头翁(*Pulsatillae radix*)、延胡索(*Corydalis rhizoma*)、草乌(*Aconiti kusnezoffii radix*)、川乌(*Aconiti radix*)、独活(*Angelicae pubescentis radix*)、皂角刺(*Gleditsiae spina*)、虎杖(*Polygoxi cuspidati rhizoma et radix*)、甘遂(*Glycyrrhizae radix et rhizoma*)、侧柏叶(*Platycladi cacumen*)、木香(*Aucklandiae radix*)等10种中药,就其对肾脏有机阴离子转运体OAT1、OAT2、OAT3所对应的小鼠体内同源物Oat1、Oat2、Oat3的影响进行研究,旨在探讨肾毒性中药引起肾损伤的作用及其机制。

1 材料

1.1 仪器

Himac CR22G型落地式高速冷冻离心机(日本日立公司);G7-953T型组织匀浆机(日本亚速旺公司);T6型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);CO-150型CO₂培养箱(New Brunswick Scientific公司);手动连续分液器(艾德中国有限公司)。

1.2 药材与试剂

药材白头翁(批号:YPA3A0001)、延胡索(批号:YPA2L0001)、草乌(批号:YPA0H0001)、川乌(批号:YPA3A0001)、独活(批号:YPA3G0002)、皂角刺(批号:YPA3H0001)、虎杖(批号:YPA3G0001)、甘遂(批号:YPA1G0001)、侧柏叶(批号:YPA3G0001)、木香(批号:YPA3H0001)均购自广州采芝林药业有限公司,由广州中医药大学中药学院黄海波教授鉴定为真品;对氨基马尿酸(PAH,批号:45037,含量:98%)、丙磺舒(批号:1350,含量:99%)均购自阿拉丁试剂上海有限公司;羧甲基纤维素钠(CMC-Na,国药集团化学试剂有限公司,批号:F20091021,含量:99%);其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

SPF级NIH小鼠1840只,♀♂兼半,体质量18~26g,购自广州中医药大学实验动物中心[实验动物使用许可证号:SCXK(粤)20080020]。

2 方法

2.1 供试品制备

取适量对应药材饮片,煎煮2次,第1次2h,第2次1h,滤液合并,浓缩至合适浓度,制成水煎剂,-20℃贮藏。

2.2 载体实验

2.2.1 模型的复制及分组、给药 取NIH小鼠1840只,随机均分为23组,即正常对照(等容纯水)组,丙磺舒(阳性对照,

30mg/kg)组,CMC-Na(等容CMC-Na)组,白头翁高、低剂量[6、1.5g(生药)/kg]组,延胡索高、低剂量[3.2、0.8g(生药)/kg]组,草乌高、低剂量[1.2、0.3g(生药)/kg]组,川乌高、低剂量[1.2、0.3g(生药)/kg]组,独活高、低剂量[3.2、0.8g(生药)/kg]组,皂角刺高、低剂量[3.2、0.8g(生药)/kg]组,虎杖高、低剂量[6.4、1.6g(生药)/kg]组,甘遂高、低剂量[0.32、0.08g(生药)/kg]组,侧柏叶高、低剂量[4、1g(生药)/kg]组,木香高、低剂量[2、0.5g(生药)/kg]组。给药剂量按参考文献[9]计算,低剂量约相当于人临床剂量的8倍(等效剂量),高剂量约为人临床剂量的32倍。ig给药,bid,连续5d。每次操作在30min内完成。

2.2.2 PAH清除实验^[10-11] 末次给药1h后,尾iv给予PAH(30mg/kg),分别于1、2.5、5、7.5、10、15、20min从每组各取10只小鼠断头取全血,放置1h后,常温下3717×g离心10min,分离血清,于-20℃贮藏。另迅速摘取右肾于-80℃贮藏。参考文献[11]对PAH清除实验中5个时间点(1、5、10、15、20min)的小鼠肾脏进行匀浆:从-80℃冰箱中取出右肾,切成小块,放入电动匀浆器中,倒入约5倍量的冰冷磷酸盐缓冲液(PBS,pH7.4),低速匀浆。20000×g离心60min,取上清液于-80℃贮藏;常规制作肾切片,并匀浆。常规测定小鼠PAH清除实验的药动学参数。

2.2.3 小鼠肾组织中PAH蓄积量的测定 参考文献[11]测定PAH含量:取200μl血清(或500μl肾匀浆液),加入定量的HCl、亚硝酸钠、尿素溶液进行重氮化,再加入Tsuda试剂显色后于570nm波长处测定其吸光度。由系列PAH标准溶液求出PAH标准曲线($y=ax+b$),以此换算出小鼠肾组织中PAH含量(以ng/μg表示)。

2.3 离体试验

每组取小鼠10只,♀♂兼半,分组及给药同“2.2.1”项下,末次给药1h后,断头处死,放血,迅速摘取右肾,置于已消毒的平板上剥离包膜并切片。用无菌手术刀从肾门沿长轴将其平分为两半,再沿长轴均分为3条(约2mm厚)后等分3块。用冰冷(冰浴)的PBS涮洗后,滤纸吸干,放入24孔培养皿中[内含1ml充足氧气的PAH-buffer(含2mmol PAH)],置于CO₂培养箱(37℃,5%CO₂)中孵育20min(每隔5min振摇5s)。孵育结束后,迅速加入250μl的35%三氯醋酸溶液并振摇混匀终止反应。同“2.2.3”项下方法测定肾切片PAH摄取量。

2.4 统计学方法

采用DAS 2.0分析软件处理药动学参数。采用SPSS 17.0软件与重复测量方差法处理实验数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠PAH清除实验的检测结果

由PAH标准溶液(质量浓度范围0.06~30μg/ml,9个质量浓度梯度)得标准曲线 $y=0.3937x-0.0025$ ($r=0.9993$),以此换算出小鼠血清、肾切片及肾组织匀浆液中的PAH含量(此法日内RSD为0.41%~9.52%,日间RSD为4.65%~10.85%,重现性为90.81%~109.14%, n 均为6)。

PAH在小鼠的体内代谢过程(即PAH肾清除实验)符合二房室模型,其药-时曲线为双指数浓度-时间曲线,符合公式 $C=A^{-\alpha t}+B^{-\beta t}$ 。与正常对照组比较,延胡索高剂量组,草乌高、低剂量组,独活高剂量组,虎杖高、低剂量组,侧柏叶高剂量组 $t_{1/2\beta}$ 延长;10种中药高、低剂量组 V_d 均降低;除独活低剂量组、皂角刺低剂量组、甘遂低剂量组外,其余用药组的CL均降低、 $AUC_{0-20\text{ min}}$ 均升高,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$),说明药物消除变慢,同时分布到全身的速度加快。与CMC组比较,正常对照组各项参数差异无统计学意义($P>0.05$);丙磺舒组 $t_{1/2\beta}$ 延长、 V_d 降低、CL降低、 $AUC_{0-20\text{ min}}$ 降低,差异有统计学意义($P<0.01$),说明药物消除变慢,同时分布到全身的速度也变慢。各组小鼠PAH清除实验的药动学参数见表1。

表1 各组小鼠PAH清除实验的药动学参数

Tab 1 The pharmacokinetics parameters of PAH clearance test of mice in each group

组别	$t_{1/2\beta}$, min	V_d , L/kg	CL, L·kg/h	$AUC_{0-20\text{ min}}$, min·mg/L
正常对照组	8.90 ± 1.57	0.76 ± 0.02	0.086 4 ± 0.000 8	264.18 ± 3.29
CMC-Na组	11.19 ± 1.12	0.73 ± 0.04	0.084 3 ± 0.004 9	271.57 ± 19.10
白头翁高剂量组	12.89 ± 1.70	0.51 ± 0.12**	0.068 9 ± 0.003 7**	323.32 ± 17.37**
白头翁低剂量组	9.62 ± 2.43	0.59 ± 0.06**	0.080 5 ± 0.005 0**	285.09 ± 5.18*
延胡索高剂量组	14.17 ± 2.35*	0.47 ± 0.02**	0.064 1 ± 0.007 2**	324.51 ± 8.85**
延胡索低剂量组	9.22 ± 1.66	0.62 ± 0.03**	0.080 5 ± 0.002 0**	281.82 ± 11.74**
草乌高剂量组	15.94 ± 2.32**	0.45 ± 0.06**	0.068 2 ± 0.006 9**	314.42 ± 17.57**
草乌低剂量组	14.06 ± 2.81*	0.48 ± 0.12**	0.067 5 ± 0.004 0**	295.73 ± 18.38**
川乌高剂量组	12.23 ± 2.47	0.47 ± 0.03**	0.067 4 ± 0.004 1**	325.99 ± 5.14**
川乌低剂量组	9.68 ± 3.86	0.52 ± 0.06**	0.077 0 ± 0.003 1**	296.00 ± 19.09**
独活高剂量组	17.58 ± 11.10**	0.47 ± 0.08**	0.072 0 ± 0.007 5**	305.05 ± 25.38**
独活低剂量组	11.33 ± 2.26	0.58 ± 0.09**	0.083 0 ± 0.005 9	274.45 ± 19.40
皂角刺高剂量组	7.88 ± 1.62	0.50 ± 0.07**	0.074 3 ± 0.004 3**	320.08 ± 20.06**
皂角刺低剂量组	7.03 ± 1.68	0.55 ± 0.02**	0.083 6 ± 0.007 0	283.39 ± 28.76
虎杖高剂量组	30.82 ± 8.88**	0.39 ± 0.04**	0.061 6 ± 0.001 8**	371.75 ± 16.84**
虎杖低剂量组	21.89 ± 13.28**	0.54 ± 0.11**	0.075 9 ± 0.014 1**	312.55 ± 41.37**
甘遂高剂量组	9.27 ± 1.84	0.62 ± 0.10**	0.082 1 ± 0.003 6**	285.98 ± 13.43*
甘遂低剂量组	8.84 ± 0.47	0.62 ± 0.02**	0.089 5 ± 0.007 9	259.98 ± 17.58
侧柏叶高剂量组	36.6 ± 16.17**	0.31 ± 0.12**	0.057 9 ± 0.004 8**	406.72 ± 16.94**
侧柏叶低剂量组	8.97 ± 3.79	0.50 ± 0.06**	0.066 5 ± 0.006 9**	353.65 ± 35.33**
木香高剂量组	8.97 ± 4.32	0.41 ± 0.20**	0.066 1 ± 0.002 5**	357.96 ± 6.06**
丙磺舒组	16.98 ± 2.15*	0.33 ± 0.01*	0.049 5 ± 0.004 0*	437.46 ± 8.90*

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与CMC-Na组比较,# $P<0.01$

Note: vs. normal control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$; vs. CMC-Na group,# $P<0.01$

3.2 各组小鼠肾组织中PAH蓄积量的测定结果

以皂角刺高、低剂量为代表绘制PAH蓄积量-时间曲线(见图1)。随ig后时间的延长,丙磺舒组与皂角刺高、低剂量组PAH蓄积量逐渐减少。与正常对照组比较,给药1、5、10、15、20 min时,白头翁高剂量组,延胡索高剂量组,草乌高剂量组,川乌高、低剂量组,独活高、低剂量组,皂角刺高、低剂量组,虎杖高、低剂量组,甘遂高、低剂量组,侧柏叶高、低剂量组,木香高、低剂量组小鼠肾组织PAH蓄积量增加,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与CMC组比较,丙磺舒组小鼠肾组织PAH蓄积量增加,差异有统计学意义($P<0.01$)。各组小鼠肾组织中PAH蓄积量的测定结果见表2。

3.3 各组小鼠肾切片PAH摄取量的测定结果

小鼠右肾切片孵育20 min后,与正常对照组比较,延胡索

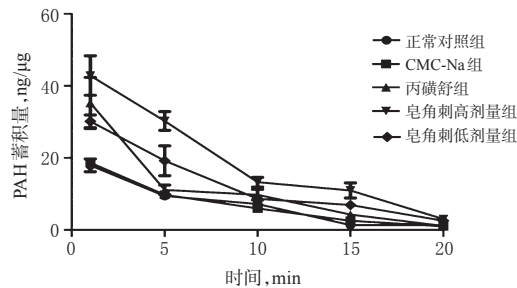


图1 PAH蓄积量-时间曲线($n=5$)

Fig 1 PAH accumulations-time curves($n=5$)

表2 各组小鼠肾组织中PAH蓄积量的测定结果($\bar{x} \pm s, n=10, \text{ng}/\mu\text{g}$)

Tab 2 Accumulation of PAH in kidney tissue of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=10, \text{ng}/\mu\text{g}$)

组别	各时间点PAH蓄积量				
	1 min	5 min	10 min	15 min	20 min
正常对照组	17.95 ± 1.79	9.43 ± 0.92	7.24 ± 0.43	1.36 ± 0.31	1.33 ± 0.40
CMC-Na组	18.65 ± 0.42	9.79 ± 0.54	5.99 ± 2.77	2.60 ± 0.59	1.01 ± 0.35
白头翁高剂量组**	24.57 ± 0.43	13.19 ± 0.19	5.18 ± 2.22	4.43 ± 0.90	1.04 ± 0.41
白头翁低剂量组	23.33 ± 1.68	11.13 ± 0.37	3.83 ± 0.23	2.37 ± 0.22	0.83 ± 0.19
延胡索高剂量组**	23.29 ± 0.39	18.10 ± 3.82	4.14 ± 1.79	4.31 ± 1.02	2.02 ± 0.54
延胡索低剂量组	13.01 ± 1.39	10.76 ± 1.29	3.41 ± 0.33	2.07 ± 0.26	1.47 ± 0.35
草乌高剂量组**	34.41 ± 1.61	8.26 ± 0.18	6.24 ± 1.58	4.55 ± 2.27	2.55 ± 0.40
草乌低剂量组	25.98 ± 0.97	7.62 ± 0.33	3.13 ± 0.17	2.15 ± 0.57	1.55 ± 0.37
川乌高剂量组**	20.81 ± 1.40	16.13 ± 0.95	9.60 ± 2.53	4.31 ± 0.99	1.21 ± 0.63
川乌低剂量组*	15.35 ± 0.73	9.69 ± 1.94	4.94 ± 0.26	1.20 ± 0.74	0.71 ± 0.28
独活高剂量组**	35.55 ± 11.19	15.39 ± 1.81	9.47 ± 1.18	6.70 ± 1.57	3.57 ± 0.83
独活低剂量组*	30.76 ± 0.89	15.29 ± 3.78	6.42 ± 0.46	2.24 ± 0.42	0.49 ± 0.04
皂角刺高剂量组**	42.88 ± 5.48	30.28 ± 2.61	13.28 ± 1.36	10.98 ± 2.10	3.05 ± 0.50
皂角刺低剂量组**	30.16 ± 1.75	19.23 ± 4.15	8.67 ± 0.73	6.94 ± 0.64	2.56 ± 0.76
虎杖高剂量组**	66.93 ± 2.60	26.45 ± 1.55	7.45 ± 1.06	3.74 ± 0.45	2.79 ± 0.42
虎杖低剂量组**	27.57 ± 1.18	26.46 ± 0.59	4.33 ± 0.64	3.54 ± 0.59	2.64 ± 0.71
甘遂高剂量组**	51.78 ± 4.96	36.73 ± 1.87	9.05 ± 2.56	5.04 ± 2.75	3.13 ± 0.44
甘遂低剂量组**	28.85 ± 1.13	21.31 ± 2.31	7.91 ± 0.66	4.18 ± 0.15	2.53 ± 0.68
侧柏叶高剂量组**	57.13 ± 8.32	40.13 ± 2.71	16.05 ± 1.32	12.67 ± 5.17	9.75 ± 3.01
侧柏叶低剂量组**	27.11 ± 1.48	21.39 ± 4.81	10.32 ± 1.99	5.92 ± 1.23	3.13 ± 1.09
木香高剂量组**	65.58 ± 5.52	31.17 ± 0.97	16.31 ± 1.18	10.26 ± 2.73	6.61 ± 1.05
木香低剂量组**	37.23 ± 2.33	25.20 ± 0.95	12.13 ± 1.92	5.89 ± 1.20	4.86 ± 1.18
丙磺舒组*	35.28 ± 9.11	11.13 ± 1.33	9.79 ± 1.46	4.31 ± 0.25	1.11 ± 0.37

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与CMC-Na组比较,# $P<0.01$

Note: vs. normal control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$; vs. CMC-Na group,# $P<0.01$

高剂量组,草乌高、低剂量组,皂角刺高、低剂量组,甘遂高剂量组,侧柏叶高、低剂量组,木香高剂量组小鼠肾切片PAH蓄积量减少,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与CMC组比较,丙磺舒组小鼠肾切片PAH蓄积量减少,差异有统计学意义($P<0.01$)。各组小鼠肾切片PAH摄取量的测定结果见表3。

4 讨论

转运体(即膜转运体,Membrane transporter)是一类跨细胞膜转运各种内源性和外源性化合物的功能蛋白。OATs主要负责将血液中的有机阴离子转运到近端小管上皮细胞内,其转运异常与肾功能受损有关。笔者用Oat1、Oat2、Oat3的共同

表3 各组小鼠肾切片PAH摄取量的测定结果($\bar{x} \pm s, n=10, \text{ng}/\mu\text{g}$)

Tab 3 Accumulation of PAH uptake of kidney slices of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=10, \text{ng}/\mu\text{g}$)

组别	PAH蓄积量	相对摄取量	组别	PAH蓄积量	相对摄取量
正常对照组	402.72 ± 144.32	100	皂角刺高剂量组	92.26 ± 36.75*	22.85
CMC-Na组	421.82 ± 70.39	104.73	皂角刺低剂量组	99.03 ± 24.45*	24.59
白头翁高剂量组	315.38 ± 91.89	78.31	虎杖高剂量组	327.81 ± 80.17	81.40
白头翁低剂量组	345.08 ± 45.00	85.69	虎杖低剂量组	390.32 ± 79.14	96.92
延胡索高剂量组	222.88 ± 40.98*	55.34	甘遂高剂量组	268.12 ± 90.34**	66.58
延胡索低剂量组	359.80 ± 307.84	89.34	甘遂低剂量组	292.27 ± 124.15	72.57
草乌高剂量组	204.89 ± 47.54*	50.88	侧柏叶高剂量组	166.79 ± 60.69*	41.42
草乌低剂量组	228.20 ± 42.24**	56.66	侧柏叶低剂量组	238.37 ± 39.73**	59.19
川乌高剂量组	423.06 ± 80.23	105.05	木香高剂量组	198.16 ± 33.28*	49.21
川乌低剂量组	399.80 ± 109.67	99.27	木香低剂量组	378.26 ± 114.19	93.93
独活高剂量组	430.26 ± 135.22	106.77	丙磺舒组	41.81 ± 10.07*	9.91
独活低剂量组	455.44 ± 91.24	113.09			

注:与正常对照组比较,* $P<0.01$,** $P<0.05$;与CMC-Na组比较,* $P<0.01$

Note: vs. normal control group, * $P<0.01$, ** $P<0.05$; vs. CMC-Na group, * $P<0.01$

底物PAH^[3,5]作为在体探针药,用丙磺舒作为Oat1、Oat2、Oat3的共同抑制剂^[3,5],用CMC-Na作为丙磺舒的溶剂(设立此组的目的在于排除溶剂CMC-Na对丙磺舒的影响)。丙磺舒组与CMC-Na组比较,小鼠肾组织蓄积量增加,差异均具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$),CMC-Na组与正常对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),提示丙磺舒的抑制作用可靠。以PAH的 $t_{1/2\beta}$ 、 V_d 、CL及 $AUC_{0-20\text{min}}$ 为考察指标,检测10种肾毒性中药对肾脏排泄功能的影响。

血清中PAH的药动力学研究表明,延胡索高剂量组,草乌高、低剂量组,独活高、低剂量组,虎杖高、低剂量组,侧柏叶高剂量组的 $t_{1/2\beta}$ 延长,差异均具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$),即体内PAH的消除受到抑制;各用药组 V_d 均变小,差异均具有统计学意义($P<0.01$),即药物在血中的分布降低;除独活低剂量组、皂角刺低剂量组外,其他各用药组CL变小、 $AUC_{0-20\text{min}}$ 增大,差异具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。这是由于受试中药明显抑制了转运体Oat1、Oat2、Oat3对PAH的摄取,使得血中的PAH含量增加、排泄量减少。

笔者就7个采血点中的5个时间点对小鼠肾脏PAH蓄积量进行定量,发现除白头翁低剂量组、草乌低剂量组、川乌低剂量组外,其他各用药组小鼠肾组织中PAH蓄积量明显比正常对照组高,差异均具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$),说明肾脏排泄功能受阻,PAH不能顺利经肾排入尿液,而是蓄积在肾脏中,进一步证明肾毒性中药通过抑制肾小管基底膜上的Oat1、Oat2、Oat3干扰对PAH的摄取,从而导致排泄减少使得肾脏中蓄积量增加。

为进一步考察供试中药对肾脏Oats的影响,本研究以肾切片PAH摄取试验考察了肾脏摄取型转运体对底物(PAH)的摄取能力。以正常对照组的PAH摄取量作为参照值,用药组与其摄取量的百分比作为相对摄取量,结果显示,延胡索高剂量组,草乌高、低剂量组,皂角刺高、低剂量组,甘遂高剂量组,侧柏叶高、低剂量组,木香高剂量组摄取的PAH量明显低于正

常对照组,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$),说明用药组小鼠肾脏摄取功能受到抑制。

结合PAH清除实验中主要药动力学参数、肾组织PAH蓄积量及肾切片PAH摄取量结果,可推断本实验所测肾毒性中药的肾损害作用可能是通过抑制肾脏有机阴离子转运体Oat1、Oat2、Oat3的功能而实现。

参考文献

- [1] Duan P, You G. Novobiocin is a potent inhibitor for human organic anion transporters[J]. *Drug Metab Dispos*, 2009,37(6):1 203.
- [2] Sweet DH, Miller DS, Pritchard JB, et al. Impaired organic anion transport in kidney and choroid plexus of organic anion transporter 3 (Oat3 (Slc22a8)) knockout mice[J]. *J Biol Chem*, 2002,30(277):26 934.
- [3] Xue X, Gong LK, Maeda K, et al. Critical role of organic anion transporters 1 and 3 in kidney accumulation and toxicity of aristolochic acid I [J]. *Mol Pharm*, 2011, 8(6): 2 183.
- [4] Bakhiya N, Arlt VM, Bahn A, et al. Molecular evidence for an involvement of organic anion transporters (OATs) in aristolochic acid nephropathy[J]. *Toxicology*, 2009, 264(1/2):74.
- [5] Babu E, Takeda M, Nishida R, et al. Interactions of human organic anion transporters with aristolochic acids[J]. *J Pharmacol Sci*, 2010, 113(2): 192.
- [6] Weaver YM, Ehresman DJ, Butenhoff JL, et al. Roles of rat renal organic anion transporters in transporting perfluorinated carboxylates with different chain lengths[J]. *Toxicol Sci*, 2010, 113(2):305.
- [7] Nakakariya M, Shima Y, Shirasaka Y, et al. Organic anion transporter OAT1 is involved in renal handling of citrulline[J]. *J Physiol Renal Physiol*, 2009, 297(1):71.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:3-362.
- [9] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9):1 069.
- [10] Miyamoto Y, Watanabe H, Noguchi T, et al. Organic anion transporters play an important role in the uptake of p-cresyl sulfate, a uremic toxin, in the kidney[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(8):2498.
- [11] Kiguchi M, Sudo J. Comparative study of colorimetric method using diazotization reaction and high-performance liquid chromatographic method in determination of para-aminonipponic acid[J]. *J Toxicol Sci*, 1987, 12(3): 301.

(收稿日期:2014-03-22 修回日期:2014-06-04)

(编辑:张 静)