

大黄素ig昆明小鼠长期毒性研究

霍桂桃^{1#}, 王亚楠^{1#}, 吕建军¹, 杨艳伟¹, 林志¹, 屈哲¹, 汪祺^{2*}, 文海若^{1*}

1. 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176

2. 中国食品药品检定研究院中药民族药检定所, 北京 100050

摘要: 目的 通过连续28 d ig给予昆明小鼠大黄素, 进而对其全身毒性和潜在的肝、肾毒性进行评价。方法 40只雄性昆明小鼠随机分成溶媒对照组(0.5% CMC-Na)和大黄素低、中、高剂量(100、300、600 mg/kg)组, 最初的最高给药剂量为1 000 mg/kg, 从给药第6天起将给药剂量调整为600 mg/kg, 每组10只, 连续给药28 d后进行解剖, 给药后第57天进行恢复期解剖。给药后观察动物的大体症状, 并进行体质量和肝、脾、肾、肾上腺及肠系膜淋巴结质量的测定、血清生化指标检测, 以及大体和组织病理学检查。结果 给药结束, 与溶剂对照组比较, 大黄素高剂量组动物的平均体质量在试验的第3、7、10、14、17、21、28天显著降低($P < 0.05, 0.01, 0.001$); 中、高剂量组动物血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平升高, 低、中剂量组动物血清天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平升高, 未见统计学的显著性差异, 低、中、高剂量组的其他血清生化指标均未见明显变化; 低、中、高剂量组绝对脏器质量及脏器指数均未见统计学的显著性差异。试验期间高剂量组共有6只动物死亡。死亡动物大体剖检可见脾体积减小, 胸腺消失。死亡动物肝镜检可见轻度肝细胞坏死、轻度肝细胞变性/坏死伴炎性细胞浸润, 以及极轻度色素沉着; 肾镜检可见轻度肾小管变性/坏死、轻度肾小管变性/再生, 以及轻度色素沉着; 脾镜检可见轻度淋巴细胞数目减少和轻度易染体巨噬细胞增多。各组计划剖检动物大体检查未见异常。高剂量组动物肝镜检可见极轻度至轻度色素沉着; 肾镜检可见极轻度至轻度色素沉着、极轻度至轻度肾小管变性/再生; 胆囊镜检可见极轻度至轻度透明变性、轻度胆囊结石及轻度炎性细胞浸润(中性粒细胞为主)。结论 高剂量的大黄素可对动物产生明显的全身毒性作用, 并可造成肝、肾、胆囊、脾损伤, 大黄素的胆囊毒性为研究大黄素的肝、胆毒性机制提供新的思路 and 方向。

关键词: 大黄素; 单体; 小鼠; 长期毒性; 肝; 肾; 胆囊; 脾

中图分类号: R992 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)07-1425-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.07.009

Chronic toxicity study of emodin monomer in Kunming mice by ig administration

HUO Guitao¹, WANG Yanan¹, LÜ Jianjun¹, YANG Yanwei¹, LIN Zhi¹, QU Zhe¹, WANG Qi², WEN Hairuo¹

1. National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control/Key Laboratory of Beijing for Nonclinical Safety Evaluation Research of Drugs, Beijing 100176, China

2. Institute for Control of Chinese Traditional Medicine and Ethnic Medicine, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To evaluate the systemic toxicity and potential hepatotoxicity and nephrotoxicity of emodin monomer in Kunming mice by ig administration for 28 days. **Methods** 40 male Kunming (KM) mice were randomly divided into vehicle control group (0.5% CMC-Na), low dose (100 mg/kg emodin monomer), medium dose (300 mg/kg emodin monomer) and high dose (1000 mg/kg emodin monomer, which was adjusted to 600 mg/kg after administrating on day 6), with 10 animals per group. Clinical symptoms of animals were observed after administration, and body weight and organ weights (include liver, spleen, kidney, adrenal gland and mesenteric lymph node), serum biochemical indicators were measured and detected, as well as gross and histopathological

收稿日期: 2020-10-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81503347); 国家十三五“重大新药创制”专项课题(2018ZX09201017)

#共同第一作者: 霍桂桃, 副主任药师, 研究方向为毒性病理。E-mail: huoguitao@nifdc.org.cn

王亚楠, 硕士研究生, 研究方向为药理毒理。E-mail: wangyanan_ytu@126.com

*共同通信作者: 文海若, 研究员, 研究方向为药理毒理。E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

汪祺, 副研究员, 研究方向为中药毒理。E-mail: sansan8251@sohu.com

examination after administration. **Results** At the end of dosing, the mean body weight in the high dose group was significantly reduced on day 3, 7, 10, 14, 17, 21, and 28 of the experiment with a high statistical significance. There was no statistically significant difference in serum ALT levels in the middle dose and high dose groups and also in serum AST levels in the low dose group and the middle dose group. No significant change was observed in other serum biochemical indicators in the low dose group, medium dose group and high dose group. There was no statistically significant difference in absolute organ weight or relative organ/body weight ratio in the low dose group, the medium dose group and the high dose group. A total of 6 animals in the high dose group died during the experiment. The spleen was decreased in size and the thymus was disappeared in the dead animals. Microscopic examination of the dead animals showed mild hepatocyte necrosis and mild hepatocyte degeneration/necrosis with inflammatory cell infiltration, as well as mild pigmentation; mild tubular degeneration/necrosis and mild tubular degeneration/regeneration are seen in the kidneys, as well as mild pigmentation; mild decreased lymphocyte number and mild increased number of tingible body macrophages were observed in the spleen. No abnormalities were found in the planned necropsy of each group. Microscopic examination showed minimal to mild pigmentation in the liver, minimal to mild pigmentation and mild renal tubular degeneration/regeneration, as well as minimal to mild hyalinosis, mild biliary calculus and mild inflammatory cell infiltration (mainly neutrophils) in the gallbladder in the high dose group. **Conclusion** High-dose emodin monomer could produce evident systemic toxicity, and cause damages in liver, kidney, gall bladder and spleen. The gallbladder toxicity of emodin provides a new idea and direction for studying the mechanism of hepatotoxicity and biliary toxicity of emodin.

Key words: emodin; monomer; mice; chronic toxicity; liver; kidney; gallbladder; spleen

大黄素是从大黄、何首乌、芦荟等中草药中分离出来的一种天然蒽醌化合物^[1-3],被认为是大黄、何首乌等中药致肝损伤最可能的物质之一^[4-5]。研究发现,大黄的鞣质部位(以1 g/mL大黄为小鼠的中毒剂量)可致小鼠肝细胞发生损伤^[6]。2001年美国国家毒理学项目中心(National Toxicology Program, NTP)的研究结果提示,连续ig不同剂量(40~800 mg/kg)大黄素14周以上可引起大鼠和小鼠产生不同程度的肝肥大、肾小管透明小滴生成和矿化等病理学形态学改变^[7],初步证明大黄素存在肝、肾毒性风险。近年来大黄素、何首乌及其制剂的临床不良反应多有报道,尤其是临床肝损伤案例的报道较多^[8-9],受到社会的高度关注。

大黄蒽醌类(anthraquinones, AQs)包括大黄素、大黄素甲醚、大黄酚、芦荟大黄素、大黄素甲醚-8-β-D-(6'-O-乙酰基)-葡萄糖苷和大黄素-3-甲醚-8-O-β-D-葡萄糖苷等^[10-11]。先前的相关报道提示,游离蒽醌与何首乌肝毒性有关^[12]。体外细胞试验结果显示,大黄素对健康者肝细胞的抑制作用随浓度增高及作用时间延长而增加,而且大黄蒽醌类成分具有肝、肾毒性,其效应物质为体内代谢产生的结合型蒽醌和体外原形游离型蒽醌^[13-14]。目前大黄素类单体的动物长期体内肝、肾毒性研究少有报道,因此有必要对大黄素类单体开展体内研究,进一步证实大黄素类单体的肝、肾毒性及病理形态学表现。本研究通过连续28 d ig给予昆明小鼠大黄素单体,观察动物大体症状并分析体质量、血清生化指标、绝对脏器质量、脏器指数及大体和组织病理形态学

变化,对大黄素单体的全身毒性和潜在的肝、肾毒性进行评价,为揭示大黄素单体的体内毒性机制奠定基础。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级雄性昆明小鼠40只(给药时约5周龄,体质量不超过25 g),购买自中国食品药品检定研究院实验动物中心,实验动物许可证号SYXY(京)2017-005。小鼠饲养于屏障系统内PC聚碳酸酯鼠盒中,饲养环境温度保持20~26 °C,湿度保持在40%~70%。实验动物自由摄取经⁶⁰Co放射灭菌的鼠全价颗粒饲料,饮用水为经高压灭菌的自来水。

1.2 主要仪器

H500FR台式高速冷冻离心机(日本Kokusan公司);7180型全自动生化分析仪(日本日立公司);PB203-N型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);光学显微镜(日本Olympus公司);樱花TEC5EMJ-2型自动包埋机、DRS-2000自动染色机及自封片机(日本Sakura公司);全自动轮转切片机(徕卡RM2255)。

1.3 药物及主要试剂

大黄素(质量分数95%,批号T02S8F42983,上海源叶生物科技有限公司);羧甲基纤维素钠(美国Signal Aldrich公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药方式

40只雄性昆明小鼠在给药前检疫适应6 d。检疫驯化最后1天按体质量随机分组法分为4组,每

组10只,即溶媒对照组(0.5% CMC-Na)和大黄素低、中、高剂量(100、300、600 mg/kg)组,根据课题组前期研究经验以及相关报道^[15-16],设定大黄素最初的最高给药剂量为1 000 mg/kg,因在给药第4天死亡1只动物,给药第5天死亡2只动物,从给药第6天起将给药剂量调整为600 mg/kg。给药方式为ig,连续给药28 d进行解剖,给药后第57天进行恢复期解剖,给药体积为10 mL/kg。

2.2 检测指标

试验期间每日观察动物的大体症状。体质量在给药第1、3、7、10、14、17、21、24、28天各测定1次,恢复期每周测定1次,解剖日麻醉前测定1次。解剖前1天动物禁食过夜,解剖日(给药结束及恢复期结束)麻醉动物后用注射器采集腹主动脉血用于血清生化指标检测,采血量约每只0.6 mL。血液样本在室温放置1~2 h后,以4 °C、3 500 r/min离心15 min,吸取血清,使用Hitachi7180型全自动生化仪检测血清天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)、尿素(UREA)、肌酐(CRE)。

给药结束及恢复期结束各组分别解剖5只动物,高剂量组因在给药结束只剩4只动物,全部解剖,故恢复期结束高剂量组动物不进行解剖。以硫喷妥钠(60 mg/kg)麻醉,从腹腔后大静脉取血完毕后,完全放血后处死解剖,并进行大体病理学检查及记录。死亡动物(不进行脏器称质量及血清生化指标检测)迅速解剖并进行组织器官的大体病理学检查。实施大体病理学检查的脏器包括肝、脾、肾、肾上腺、胆囊、肠系膜淋巴结及病变部位,需要称质量的脏器有肝、脾、肾、肾上腺及肠系膜淋巴结。固定后的组织器官经修块取材,逐级酒精脱水,石蜡包埋,轮转切片机切片(厚约3 μm),经苏木精-伊红(HE)染色,光镜下进行组织病理学检查。

2.3 统计学方法

体质量、血清生化检查指标、绝对脏器质量和脏器指数等数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,动物的成对器官如果缺失单侧时,则不将该动物的脏器质量计入组平均数。

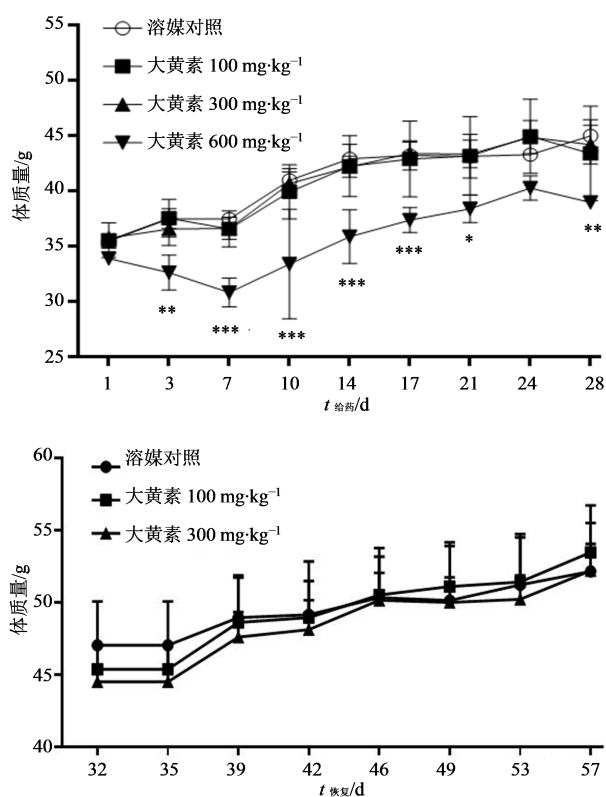
死亡及大体症状观察、大体病理学检查结果、组织病理学检查结果无需进行统计学处理,直接列出观察结果。数据图与统计结果经GraphPad Prism 7软件处理生成。

3 结果

3.1 全身毒性

试验期间,大黄素高剂量组共有6只动物死亡,

分别在给药的第4、5、6、7、8、9天死亡。死亡动物大体症状表现为精神状态差、行动迟缓、消瘦、尿液颜色偏黄。其余各组未见死亡动物以及与给予大黄素单体相关的异常症状。各组计划剖检动物未见与给予大黄素单体相关的明显症状。与溶媒对照组比较,高剂量组动物的平均体质量在给药的第3、7、10、14、17、21、28天显著降低,具有统计学意义($P < 0.05, 0.01, 0.001$);低、中剂量组的平均体质量在试验期间未见明显变化;恢复期结束,低、中剂量组的平均体质量未见明显变化。结果见图1,结果提示,按照当前的给药方式和给药剂量,大黄素高剂量可对动物整体产生明显的毒性作用。



与溶媒对照组比较: * $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs vehicle control group

图1 给药期、恢复期各组动物体质量的变化

Fig. 1 Changes of animal body weight in each group during dosing and recovery

3.2 血清生化指标检测

给药结束,与溶媒对照组动物比较,中、高剂量组动物血清ALT水平升高,统计学无显著性差异。低、中剂量组血清AST水平升高,统计学亦无显著性差异。给药结束,给药组动物的其他血清生化指标与溶媒对照组比较均未见明显统计学差异。恢复期结束,低、中剂量组动物的血清生化指标与溶媒对照组比较均未见统计学差异(表1)。考虑本研

究中血清生化指标未见统计学差异与提示脏器损伤的指标敏感性有关,即脏器发生病变时血清生化指标不一定发生明显改变,尤其是自身代偿能力较强的组织器官,如肝、肾。另外本研究主要统计不同组间血清生化指标的差异,组内个别动物生化指标的改变不一定对该个体所在组别的生化指标产生明显的影响。

3.3 脏器指数

给药结束,与溶媒对照组动物比较,低、中、高剂量组动物肝、肾、脾、肠系膜淋巴结及肾上腺的绝

对脏器质量及脏器指数均未见统计学差异。恢复期结束,与溶媒对照组动物比较,低、中剂量组动物肝、肾、脾、肠系膜淋巴结及肾上腺的绝对脏器质量及脏器指数均未见统计学差异(见表2、3)。本研究中各组计划剖检动物的脏器指数未见统计学差异,考虑可能的原因为脏器指数中体质量数据为动物解剖前最后一次称质量的数据,在进行组间脏器指数比较时,组内个别动物体质量的改变不一定对所在组别的脏器质量/体质量产生明显的影响。

表1 血清生化指标检测结果
Table 1 Results of serum biochemical indexes

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	给药结束					
		ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	ALP/(U·L ⁻¹)	TBIL/(μmol·L ⁻¹)	UREA/(mmol·L ⁻¹)	CRE/(μmol·L ⁻¹)
溶媒对照	—	28.80±5.12	48.80±6.06	101.2±18.97	4.33±0.99	7.20±1.10	10.20±2.95
大黄素	100	28.80±4.92	51.60±12.72	124.80±46.62	3.89±1.22	6.60±0.60	8.60±1.82
	300	40.00±47.00	64.00±34.77	82.25±19.16	2.97±1.48	8.20±2.84	10.25±0.96
	600	61.00±37.00	48.25±13.05	93.00±10.23	3.10±0.044	8.05±0.70	8.25±2.22
组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	恢复期结束					
		ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	ALP/(U·L ⁻¹)	TBIL/(μmol·L ⁻¹)	UREA/(mmol·L ⁻¹)	CRE/(μmol·L ⁻¹)
溶媒对照	—	24.40±2.88	48.80±7.26	43.20±16.47	3.37±0.89	9.50±2.22	14.80±1.48
大黄素	100	24.40±4.04	47.80±10.69	34.80±6.18	3.74±2.06	9.22±2.75	12.08±4.58
	300	27.00±2.83	45.50±7.78	89.00±9.90	3.10±0.21	8.35±0.92	12.50±0.71

表2 绝对脏器质量
Table 2 Absolute organ weight

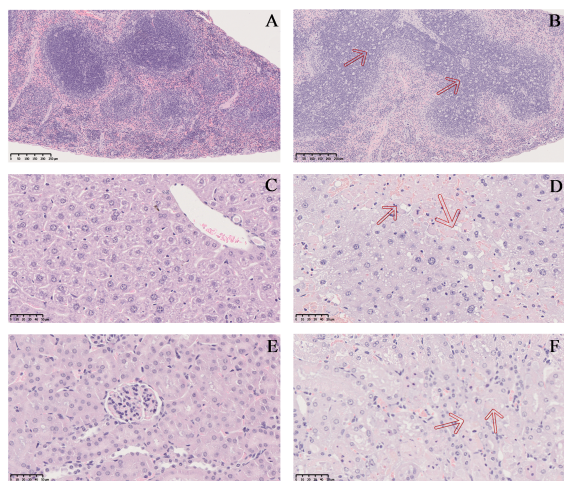
组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	给药结束				
		肝/g	肾/g	脾/g	肠系膜淋巴结/g	肾上腺/g
溶媒对照	—	1.840±0.170	0.544±0.061	0.090±0.017	0.127±0.064	0.005 1±0.001 0
大黄素	100	1.711±0.178	0.516±0.043	0.123±0.071	0.129±0.057	0.007 7±0.002 1
	300	1.745±0.104	0.526±0.058	0.100±0.026	0.148±0.077	0.007 2±0.001 7
	600	1.864±0.294	0.498±0.037	0.098±0.018	0.109±0.076	0.006 5±0.000 8
组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	恢复期结束				
		肝/g	肾/g	脾/g	肠系膜淋巴结/g	肾上腺/g
溶媒对照	—	1.726±0.123	0.537±0.053	0.162±0.065	0.118±0.050	0.006 8±0.001 3
大黄素	100	1.992±0.262	0.576±0.054	0.128±0.016	0.109±0.041	0.007 2±0.001 2
	300	1.799±0.138	0.601±0.069	0.106±0.019	0.117±0.026	0.007 5±0.002 2

表3 脏器系数
Table 3 Organ coefficient

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	给药结束				
		肝/(g·g ⁻¹)	肾/(g·g ⁻¹)	脾/(g·g ⁻¹)	肠系膜淋巴结/(g·g ⁻¹)	肾上腺/(g·g ⁻¹)
溶媒对照	—	0.040 9±0.003 9	0.012 1±0.001 5	0.002 00±0.000 37	0.002 84±0.001 53	0.000 115±0.000 023
大黄素	100	0.039 5±0.003 2	0.012 0±0.001 2	0.002 88±0.001 71	0.003 00±0.001 36	0.000 176±0.000 039
	300	0.039 5±0.049 4	0.011 9±0.001 0	0.002 25±0.000 54	0.003 33±0.001 70	0.000 165±0.000 045
	600	0.046 5±0.006 6	0.012 5±0.001 4	0.002 45±0.000 53	0.002 73±0.001 94	0.000 163±0.000 014
组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	恢复期结束				
		肝/(g·g ⁻¹)	肾/(g·g ⁻¹)	脾/(g·g ⁻¹)	肠系膜淋巴结/(g·g ⁻¹)	肾上腺/(g·g ⁻¹)
溶媒对照	—	0.033 1±0.033 1	0.010 3±0.001 1	0.003 15±0.001 42	0.002 27±0.000 97	0.000 131±0.000 031
大黄素	100	0.037 2±0.003 4	0.010 8±0.000 6	0.002 40±0.000 24	0.002 06±0.000 83	0.000 136±0.000 024
	300	0.034 4±0.001 8	0.011 5±0.001 0	0.002 02±0.000 35	0.002 23±0.000 45	0.000 144±0.000 043

3.4 组织病理学检查结果

3.4.1 死亡动物 实验期间大黄素高剂量组共有6只动物死亡,大体剖检可见脾体积减小,胸腺消失。镜检死亡动物的肝可见轻度肝细胞坏死和轻度肝细胞变性/坏死伴炎性细胞浸润,以及极轻度色素沉着;肾可见轻度肾小管变性/坏死和轻度肾小管变性/再生,以及轻度色素沉着;脾可见轻度淋巴细胞数目减少和轻度易染体巨噬细胞增多(组织病理学改变见图2,病变程度及病变频度见表4)。另外所有死亡动物的胆囊均自溶,2/6只动物的肾自溶。胆囊和肾脏自溶因动物死亡后未能及时剖检并进行脏器固定所致。死亡动物肝、肾及脾的镜检结果提示,给予高剂量的大黄素单体可造成动物严重的肝、肾及脾损伤,进而造成动物死亡。组织病理学检查的病变程度判断标准见参考文献^[17]。



A-溶媒对照组动物的脾未见异常(100×); B-高剂量组动物的脾可见淋巴细胞数目减少和易染体巨噬细胞增多(100×); C-溶媒对照组动物肝未见异常(400×); D-高剂量组动物的肝可见肝细胞坏死(箭头所示)(400×); E-溶媒对照组动物肾未见异常(400×); F-高剂量组动物肾小管变性/坏死(箭头所示)(400×)

A-no abnormality was observed in spleen of vehicle control group (100×); B-number of lymphocytes decreased and number of tingible body macrophages increased in spleen of emodin high dose group (100×); C-no abnormality was observed in liver of vehicle control group (400×); D- hepatocyte necrosis (arrow) was observed in liver of emodin high-dose group (400×); E- no abnormalities were found in kidney of vehicle control group (400×); F- renal tubular degeneration/necrosis (arrow) in emodin high-dose group (400×)

图2 大黄素高剂量组死亡动物各脏器的组织病理学变化

Fig. 2 Histopathological changes of organs in dead animals in emodin high-dose group

表4 死亡动物组织病理学检查结果

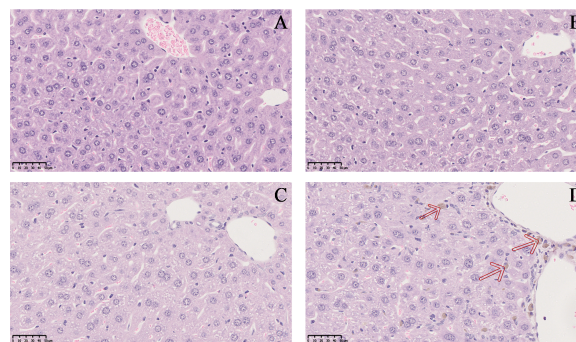
Table 4 Histopathological changes of dead animals

脏器	病理改变	病变程度	高剂量量(n=6)
肝脏	肝细胞坏死	++	5
	肝细胞变性/坏死伴炎性细胞浸润	++	1
	色素沉着	+	1
肾脏	肾小管变性/坏死	++	3
	肾小管变性/再生	++	1
	色素沉着	++	1
脾脏	淋巴细胞数目减少	++	2
	易染体巨噬细胞增多	++	3
	自溶	存在	2

“+”表示极轻度;“++”表示轻度;“+++”表示中度

“+” minimal change; “++” mild change; “+++” moderate change

3.4.2 计划剖检 动物给药结束,计划剖检动物未见明显的大体病理学改变。高剂量组动物与给予大黄素单体相关的组织病理学改变为肝极轻度至轻度色素沉着;肾极轻度至轻度色素沉着、极轻度至轻度肾小管变性/再生;胆囊极轻度至轻度透明变性、轻度胆囊结石及轻度炎性细胞浸润(中性粒细胞为主);脾脏极轻度易染体巨噬细胞增多(组织病理学检查结果见图3、4、5,病变程度及病变频度见表5)。低、中剂量组动物肝、肾、胆囊、脾未见明显的组织病理学改变。恢复期结束,低、中剂量组动物各脏器未见明显的组织病理学改变。

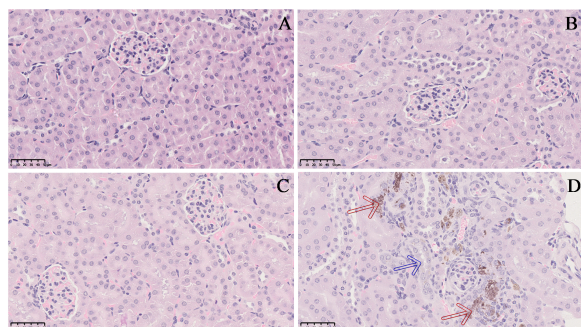


溶媒对照组(A)和大黄素低(B)、中(C)剂量组动物肝脏未见异常;高剂量组(D)动物肝脏可见色素沉着(箭头所示)

No abnormalities were observed in liver of vehicle control group (A), emodin low (B) and medium (C) dose groups. In the high-dose group (D), pigmentation was seen in the liver (arrow)

图3 给药结束各组计划剖检动物肝脏的组织病理学变化(400×)

Fig. 3 Histopathological changes of liver in scheduled animals in each group at end of administration (400×)

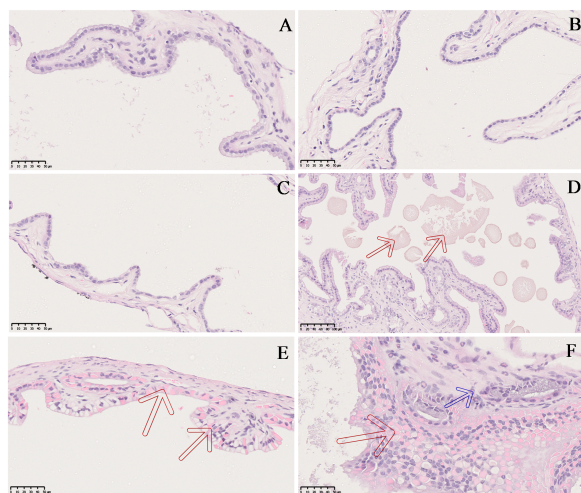


溶媒对照组(A)和大黄素低(B)、中(C)剂量组动物肾脏未见异常;高剂量组(D)动物肾脏可见色素沉着(红色箭头所示)及肾小管变性/再生(蓝色箭头所示)

No abnormalities were observed in kidney of mice in vehicle control group (A), low-dose (B) and medium-dose (C) emodin groups. kidney of high-dose group (D) had hyperpigmentation (red arrow) and tubular degeneration/regeneration (blue arrow).

图4 计划剖检动物肾脏的组织病理学变化(400×)

Fig. 4 Histopathological changes of kidney in scheduled animals in each group at end of administration (400×)



溶媒对照组(A)和大黄素低(B)、中(C)剂量组动物胆囊未见异常;高剂量组动物胆囊可见胆结石(箭头所示)(D)、透明变性(红色箭头所示)(E)、中性粒细胞浸润(蓝色箭头所示)(F)

No abnormalities were observed in gallbladder of mice in vehicle control group (A), low (B) and medium (C) emodin dose groups. Gall stones (arrow) (D), hyaline degeneration (red arrow) (E), neutrophils infiltration (blue arrow) (F) were seen in gallbladder of animals in high-dose group

图5 计划剖检动物胆囊的组织病理学变化(400×)

Fig. 5 Histopathological changes of gall bladder in scheduled animals in each group at end of administration (400×)

4 讨论

4.1 大黄素致肝和肾的组织病理学改变

大黄和何首乌是常见的中药材,二者的主要有效成分为大黄蒽醌类成分,包括大黄酸、大黄素、芦荟

表5 给药结束计划剖检动物的组织病理学检查结果
Table 5 Histopathological changes of scheduled animals at end of administration

脏器	病理改变	病变程度	大黄素高剂量(n=4)
肝	色素沉着	+	2
		++	1
肾	色素沉着	+	1
		++	2
	肾小管变性/再生	+	1
		++	2
胆囊	透明变性	+	2
		++	2
	炎性细胞浸润(中性粒细胞为主)	++	1
	结石	++	1
脾	易染体巨噬细胞增多	+	1

“+”表示极轻度;“++”表示轻度;“+++”表示中度;大黄素低、中剂量病变数量均为0

"+" minimal change; "++" mild change; "+++" moderate change; Number of lesions at low and medium doses of emodin was 0

荟大黄素、大黄素甲醚等。现代药理学研究显示,大黄和何首乌具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、保肝、保肾、清除自由基、免疫调节等作用^[16-19]。近年来关于大黄、何首乌及其制剂的临床不良反应多有报道,尤其是临床肝损伤案例的报道较多^[8-9],并受到社会的高度关注。相关的研究还发现低剂量大黄素可促进肝细胞生长,高剂量大黄素可抑制肝细胞生长,这说明大黄素对肝细胞的作用具有双重性。Wang等^[5,20]的研究发现幼年大鼠对大黄素的耐受性较老年大鼠强,而且还发现大黄素具有保肝和肝毒性的双重作用,即分别给予正常大鼠和四氯化碳(CCl_4)致肝损伤大鼠不同剂量的大黄提取物后,高剂量(40 g/kg)的大黄提取物对正常大鼠及肝损伤大鼠均产生毒性作用,而低剂量(2 g/kg)的大黄提取物对 CCl_4 所致肝损伤具有保护作用。张陆勇等^[21]的研究结果显示,在大鼠长期毒性试验中,ig给予高剂量(4 500 mg/kg)的大黄总蒽醌后大鼠出现精神不佳、体质量增长缓慢、肾近曲小管上皮细胞肿胀及变性,且肾的上述形态学改变是可逆的。黄婉奕等^[22]的研究结果显示,长期给予小鼠低、高剂量(0.8、1.6 g/kg)大黄素后,小鼠体质量下降明显,肾脏指数降低,血清尿素氮和血肌酐明显升高。

本研究发现,试验期间给予大剂量(未调整给药剂量前,1 000 mg/kg)的大黄素后,动物表现为精神状态差、行动迟缓、消瘦、尿液颜色偏黄,进而出

现动物死亡情况。死亡动物的组织病理学检查显示,与给予大黄素相关的肝、肾形态学改变主要是:肝轻度肝细胞坏死、轻度肝细胞变性/坏死伴炎性细胞浸润、轻度色素沉着;肾轻度肾小管变性/坏死、轻度肾小管变性/再生、轻度色素沉着。上述肝、肾的形态学改变提示,给予大剂量的大黄素可导致肝、肾损伤,最终造成动物死亡。而低、中剂量组计划剖检动物的肝和肾未见明显的形态学改变。调整给药剂量后的高剂量组(600 mg/kg)计划剖检动物肝可见极轻度至轻度色素沉着、肾极轻度至轻度色素沉着和轻度至轻度肾小管变性/再生。比较未调整给药剂量的高剂量组动物肝和肾的形态学改变程度要轻的多,同时也体现在大黄素对动物的全身毒性。恢复期结束,肝和肾的形态学改变均恢复。本研究的结果显示,在28 d的长期毒性研究中,给予低、中剂量(100、300 mg/kg)大黄素单体不会造成动物肝及肾损伤,给予600 mg/kg的大黄素会造成极轻度至轻度的肝和肾损伤,以上研究结果与Wang等的^[5]研究结果及相关的报道相符,进一步证实大黄素具有剂量相关的肝、肾毒性。

4.2 大黄素致脾的组织病理学改变

大黄素可致脾等免疫器官应激反应的相关研究尚未见报道。本研究发现,1/6只高剂量组死亡动物大体剖检可见脾体积减小,组织病理学检查显示脾轻度(2/6)淋巴细胞数目减少和轻度(3/6)易染体巨噬细胞增多。组织病理学检查还发现1/6只高剂量组计划剖检动物的脾极轻度易染体巨噬细胞增多。溶媒对照组动物的脾未见上述大体及组织病理学改变。另外在大体病理学检查时还发现2/6只高剂量组死亡动物的胸腺消失,1/6只高剂量组计划剖检动物的胸腺消失。因试验方案中未设计对胸腺进行组织病理学检查,因此也未收集计划剖检动物的胸腺进行组织病理学检查。上述研究结果提示,给予大剂量的大黄素后可对高剂量组动物的免疫系统造成急性应激损伤,导致淋巴细胞坏死,进而激活巨噬细胞吞噬坏死的淋巴细胞,从而导致组织形态学上的易染体巨噬细胞增多及淋巴细胞数目减少的改变。上述脾及胸腺的大体和/或组织病理学改变提示,在大黄素肝、肾毒性研究中要密切关注免疫器官的变化,其可能与给予大剂量大黄素引起动物死亡有关。

4.3 大黄素致胆囊的组织病理学改变

大黄素具有保肝利胆作用,可促进胆汁、胆汁酸和胆红素分泌,疏通胆道和微细胆小管内淤积的

胆汁,松弛奥狄括约肌,促进胆囊收缩,进而增加胆汁排出^[1,23]。王羊等^[24]学者的研究显示,大黄素可抑制成核因子黏蛋白形成,降低胆总管压力和胆囊管阻力,改善胆囊收缩性,提高胆囊排空率,阻止胆固醇聚集、增大、成石。而本研究发现,高剂量组计划剖检动物可见胆囊上皮细胞极轻度至轻度透明变性、炎性细胞浸润(中性粒细胞为主)及胆结石。溶媒对照组动物胆囊未见上述组织形态学改变。相关的报道认为胆囊上皮细胞中的透明蛋白是Ym1/Ym2,即Chi3l3(Chitinase 3-like 3),是一种功能未知的类几丁质酶样蛋白,与镰状细胞病小鼠的胆囊结石形成有关。胆囊上皮细胞透明变性在大多数品系的小鼠中罕见,在129和B6小鼠以及一些基因工程小鼠中发生率较高^[25]。关于大黄素对胆囊毒性作用的报道少见,多数报道集中在大黄素的保肝利胆和抗胆囊癌的作用及机制方面。根据本研究的组织病理学检查结果,初步认为长期大剂量给予大黄素可导致KM小鼠胆囊上皮细胞发生透明变性、炎性细胞浸润(中性粒细胞为主)及胆囊结石形成,同时大黄素引起的胆囊病变为研究大黄素的肝、胆毒性机制提供新的思路 and 方向。

大黄素广泛地存在于多种中药中,而且大量的研究报道显示大黄素存在肝、肾毒性风险,再加上近年来含大黄素中药及其制剂的临床不良反应报道,使得临床应用含大黄素的中药及其制剂慎之又慎。因此非常有必要对大黄素进行体内长期毒性研究。本研究中ig给予高剂量的大黄素可对昆明小鼠产生明显的全身毒性作用,并造成动物肝、肾、胆囊损伤,希望本研究的结果为进一步探索大黄素肝、胆毒性机制提供形态学基础及新的研究思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ma L P, Zhao L, Hu H H, et al. Interaction of five anthraquinones from rhubarb with human organic anion transporter 1 (SLC22A6) and 3 (SLC22A8) and drug-drug interaction in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 153 (3): 864-871.
- [2] 窦志华, 许波, 施忠, 等. 大黄蒽醌类成分肝肾毒性和效应物质研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(10): 1214-1217.
- [3] Dou Z H, Xu B, Shi Z, et al. Study on the liver and kidney toxicity and effective substances of rhubarb anthraquinone [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2018, 34(10):

- 1214-1217.
- [3] 由田. 过量大黄致肝细胞损伤的研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2005.
You T. Study on hepatocyte injury caused by excessive rhubarb [D]. Shenyang: China Medical University, 2005.
- [4] 韦美金, 黄娟, 白俊其, 等. 大黄素对大鼠血清肝功能、肝脏转运蛋白及代谢酶 UGT1A1 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(7): 1551-1555.
Wei M J, Huang J, Bai J Q, et al. Effects of emodin on serum liver function, liver transporter and metabolic enzyme UGT1A1 expression in rats [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2018, 29(7): 1551-1555.
- [5] Wang J B, Kong W J, Wang H J, et al. Toxic effects caused by rhubarb (*Rheum palmatum* L.) are reversed on immature and aged rats [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 134(2): 216-220.
- [6] 王建平. 大黄有毒物质基础的研究 [J]. 中国民族民间医药, 2011, 20(24): 63-64.
Wang J P. Study of toxic substance of rhubarb [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm, 2011, 20(24): 63-64.
- [7] National Toxicology Program. NTP toxicology and carcinogenesis studies of EMODIN (CAS NO. 518-82-1) feed studies in F344/N rats and B₆C₃F₁ mice [J]. Natl Toxicol Program Tech Rep Ser, 2001, 493: 1-278.
- [8] Guan Q X, Liang S W, Wang Z H, et al. ¹H NMR-based metabonomic analysis of the effect of optimized rhubarb aglycone on the plasma and urine metabolic fingerprints of focal cerebral ischemia-reperfusion rats [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 154(1): 65-75.
- [9] 胡樱凡, 向丽, 王平, 等. 大黄肝肾毒性及其减毒方法现代研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(11): 34-41.
Hu Y F, Xiang L, Wang P, et al. Hepatotoxicity and nephrotoxicity of *Rhei Radix et Rhizoma* and its attenuation methods [J]. Chin J Experim Tradit Med Form, 2019, 25(11): 34-41.
- [10] 文海若, 毛志慧, 耿兴超, 等. 人源Hepa RG肝细胞毒性与遗传毒性高通量筛选方法的初步建立 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(11): 1550-1558.
Wen H R, Mao Z H, Geng X C, et al. Preliminary validation of high throughput screening methods for hepatotoxicity and genotoxicity in humanized HepaRG cells [J]. Drug Eval Res, 2017, 40(11): 1550-1558.
- [11] Cao Y J, Pu Z J, Tang Y P, et al. Advances in bio-active constituents, pharmacology and clinical applications of rhubarb [J]. Chin Med, 2017, 12: 36.
- [12] Zhang L, Chang J H, Zhang B Q, et al. The pharmacokinetic study on the mechanism of toxicity attenuation of rhubarb total free anthraquinone oral colon-specific drug delivery system [J]. Fitoterapia, 2015, 104: 86-96.
- [13] 任历, 杨伟, 张诗缙, 等. 大黄鞣质对人肾小管上皮细胞毒性作用及量-毒关系研究 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(4): 132-135.
Ren L, Yang W, Zhang S T, et al. The study on the toxicity and dose-response relationship of tannin extracted from Rhubarb on HK-2 cell [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2015, 31(4): 132-135.
- [14] 淡墨, 刘栋, 黄舒佳, 等. 3D肝细胞模型研究大黄素型单蒽酮肝细胞毒性 [J]. 中国新药杂志, 2019, 28(11): 1312-1317.
Dan M, Liu D, Huang S J, et al. Study the hepatotoxicity of monoanthrone with emodin-type using *in vitro* 3D liver model [J]. Chin J New Drugs, 2019, 28(11): 1312-1317.
- [15] 文海若, 颜玉静, 宋捷, 等. 大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷的体外遗传毒性评价 [J]. 中国药房, 2020, 31(1): 18-23.
Wen H R, Yan Y J, Song J, et al. Study on *in vitro* and *in vivo* Genotoxicity of Emodin-8-O-β-D-glucoside [J]. J China Pharm, 2020, 31(1): 18-23.
- [16] 任璐, 文海若, 吕建军, 等. SD大鼠重复给予大黄素架酯肝毒性与遗传毒性研究 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(10): 1719-1726.
Ren L, Wen H R, Lv J J, et al. Hepatotoxicity and genotoxicity study of physcion in SD rats with repeated doses [J]. Chin J Pharm Anal, 2018, 38(10): 1719-1726.
- [17] 吕建军, 范玉明, 林志, 等. 毒性病理学大鼠和小鼠病变术语和专断标准国际统一项目简介 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(15): 1749-1753.
Lü J J, Fan Y M, Lin Z, et al. The overview of international harmonization of nomenclature and diagnostic criteria for lesions in rats and mice in toxicologic pathology [J]. Chin J New Drugs, 2013, 22(15): 1749-1753.
- [18] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 23-24.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2015.
- [19] 王玉, 杨雪, 夏鹏飞, 等. 大黄化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4821-4837.
Wang Y, Yang X, Xia P F, et al. Research progress on chemical composition and pharmacological effects of *Rhei Radix et Rhizoma* and predictive analysis on quality markers [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(19): 4821-4837.
- [20] Wang J, Zhao H, Zhao Y, et al. Hepatotoxicity or hepatoprotection? Pattern recognition for the paradoxical effect of the Chinese herb *Rheum palmatum* L.

- in treating rat liver injury [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e24498.
- [21] 张陆勇, 江振洲, 濮存海, 等. 大黄总蒽醌对SD大鼠灌胃给药的长期毒性研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2004, 24(4): 206-209.
- Zhang L Y, Jiang Z Z, Pu C H, et al. Six-month oral toxicity study of total anthraquinone in *radix et rhizoma rhei* in SD rats [J]. Chin J Biochem Pharm, 2004, 24(4): 206-209.
- [22] 黄婉奕, 李彦桥, 蒋 晴, 等. 大黄素对小鼠肾脏毒性表现的凋亡机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(11): 42-47.
- Huang W Y, Li Y Q, Jiang Q, et al. et al. Apoptosis mechanism of emodin on renal toxicity in mice [J]. Chin J Pharm Anal, 2018, 38(10): 1719-1726.
- [23] Fang B J, Shen J Y, Zhang H, et al. Effect of emodin on mobility signal transduction system of gallbladder smooth muscle in Guinea pig with cholelithiasis [J]. Chin J Experim Tradit Med Form, 2018, 38(10): 1719-1726.
- [24] 王 羊, 张 成, 冯金鸽, 等. 大黄素影响胆固醇结石形成的实验研究 [J]. 陕西医学杂志, 2016, 45(6): 656-658.
- Wang Y, Zhang C, Feng J G, et al. Effects of emodin on cholesterol stone formation [J]. Shaanxi Med J, 2016, 45 (6): 656-658.
- [25] Thoolen B, Maronpot R R, Harada T, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system [J]. Toxicol Pathol, 2010, 38: 5-81.

[责任编辑 兰新新]