

马兜铃酸I致 C57BL/6 和 C3H/He 小鼠急性毒性研究

霍桂桃, 秦超, 王超, 林志, 屈哲, 李双星, 杨艳伟, 张頔, 文海若*

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

摘要: 目的 拟通过比较不同品系小鼠对马兜铃酸I (AAI) 的耐受性及急性毒性反应, 以期研究 AAI 提供借鉴和指导。方法 采用 ig 给药方式, 单次给予 C57BL/6 和 C3H/He 小鼠 AAI (5.0、9.3、17.1、31.7、58.6、108.4、200.5 mg·kg⁻¹), 每种品系小鼠均设置 1 个溶媒对照组, 并于给药后进行一般症状观察及体质量测定。试验结束进行剖检、脏器称质量、血清生化指标检测及病理学检查。**结果** 单次给予一定剂量 AAI 可引起 2 种品系小鼠出现体质量下降、消瘦、弓背及活动减少, 甚至死亡, 并且 C57BL/6 小鼠出现上述改变的 AAI 剂量低于 C3H/He 小鼠。C57BL/6 小鼠的 AAI 半数致死量 (LD₅₀) 为 38.07 mg·kg⁻¹, C3H/He 小鼠的 AAI LD₅₀ 为 59.92 mg·kg⁻¹。C57BL/6 小鼠 AAI 最大耐受剂量 (MTD) 为 17.1 mg·kg⁻¹, C3H/He 小鼠的 AAI MTD 为 31.7 mg·kg⁻¹。给予一定剂量的 AAI 后, C57BL/6 小鼠各项血清生化指标未见改变, 而 C3H/He 小鼠血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、肌酐 (CRE) 水平升高。AAI 可引起 C57BL/6、C3H/He 小鼠多个脏器出现急性损伤, 如胸腺、脾脏、肾脏、肝脏及前胃, 并且引起 C3H/He 小鼠上述组织器官出现组织病理学改变的 AAI 剂量均低于 C57BL/6 小鼠。**结论** 通过对不同剂量 AAI 所引起 C57BL/6 和 C3H/He 小鼠整体毒性、血清生化指标、动物死亡原因以及组织病理学改变分析, 认为 C3H/He 小鼠对 AAI 的急性毒性比 C57BL/6 小鼠更加敏感。既验证了 AAI 致 C57BL/6 和 C3H/He 小鼠的急性毒性特点和作用的靶器官, 也为研究不同品系小鼠对 AAI 急性毒性的敏感性和耐受性提供了数据支持。

关键词: 马兜铃酸 I; C57BL/6 小鼠; C3H/He 小鼠; 急性毒性; 肾毒性

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 08-1827-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.08.016

Short-term toxicity of aristolochic acids I in C57BL/6 and C3H/He mice

HUO Guitao, QIN Chao, WANG Chao, LIN Zhi, QU Zhe, LI Shuangxing, YANG Yanwei, ZHANG Di, WEN Hairuo

Key Laboratory of Beijing for Safety Evaluation of Drugs, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China

Abstract: Objective To compared the tolerance and toxicity of different strains of mice to aristolochic acid I (AAI) to provide a reference and guidance for the study of AAI. **Methods** C57BL/6 and C3H/He mice were treated with AAI by oral gavage. Each strain of mice was assigned one vehicle control and seven AAI dose (5.0, 9.3, 17.1, 31.7, 58.6, 108.4, and 200.5 mg·kg⁻¹) groups, and clinical symptom observation and weight measurement were performed after dosing. At the end of the experiment, necropsy, organ weighing, serum biochemical index detection, and pathological examination were performed. **Results** A single administration of a certain dose of AAI caused weight loss, emaciated, arched back, reduced activity, and even death in both strains of mice, and the dosage of AAI in C57BL/6 mice with the above changes was lower than that in C3H/He mice. The AAI median lethal dose (LD₅₀) of C57BL/6 mice was 38.07 mg·kg⁻¹, and that of C3H/He mice was 59.92 mg·kg⁻¹. The maximum tolerated dose (MTD) of AAI in C57BL/6 mice was 17.1 mg·kg⁻¹, and that in C3H/He mice was 31.7 mg·kg⁻¹. AAI did not induce serum biochemical changes in C57BL/6 mice, while increased levels of ALT, AST, and CRE were found in C3H/He mice. AAI can cause acute injury to multiple organs in C57BL/6 and C3H/He mice, such as the thymus, spleen, kidneys, liver, and forestomach. And the dose of AAI causing histopathological changes in the the above-mentioned tissues and organs of C3H/He mice was lower than that of C57BL/6 mice. **Conclusion** By analyzing the overall toxicity, serum biochemical indicators, causes of animal death, and histopathological changes

收稿日期: 2024-03-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81503347); 药品监管科学全国重点实验室课题(2023SKLDRS0128)

*共同第一作者: 霍桂桃, 主任药师, 研究方向为临床前药物安全性评价。E-mail: huoguitao@nifdc.org.cn

秦超, 主管技师, 研究方向为实验动物技术。E-mail: 123642651@qq.com。

*通信作者: 文海若, 研究员, 研究方向为临床前药物安全性评价。E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

caused by different doses of AAI in C57BL/6 and C3H/He mice, it was concluded that C3H/He mice were more sensitive to acute toxicity of AAI than C57BL/6 mice. This study not only verified the acute toxicity characteristics and target organs of AAI on C57BL/6 and C3H/He mice, but also provided rich data support for comparing the sensitivity and tolerance of different strains of mice to AAI acute toxicity, and provided detailed reference data for more scientific and reasonable research on AAI in the future.

Key words: aristolochic acid I; C57BL/6 mice; C3H/He mice; acute toxicity; nephrotoxicity

马兜铃酸(AAs)也称马兜铃总酸,广泛存在于马兜铃属植物中^[1]。有证据表明AAs对人体具有肾毒性、遗传毒性和致癌性作用^[2-3],其可诱导大鼠和小鼠的前胃、肾脏、膀胱和肺脏发生肿瘤^[4]。Mengs^[5]于1987年首次利用Wistar大鼠和NMRI小鼠评估了AAs的急性毒性,并且得出在不同处理方式下AAs的半数致死量(LD₅₀)范围,提出AAs的LD₅₀因实验动物种属和性别而异。Mengs的研究还认为AAs不仅能对淋巴系统器官、肾脏和前胃产生急性毒性,而且对肾上腺、肝脏、十二指肠、睾丸、附睾都有一定的损伤。AAs可致肾毒性已成为共识,泌尿系统致癌性的发现使得AAs被列为I类致癌物^[6-7]。相关体内研究结果显示AAs致肾损伤的直接靶点是近曲小管^[8-9]。Sato等^[10]的研究显示AAI的毒性远大于AAII,前者可诱导BALB/c和C3H/He小鼠出现严重的肾小管坏死,而后者仅可诱发轻度局灶性肾脏间质改变。目前有关AAs的急性毒性研究报道多数集中于AA混合物,本研究就多个剂量水平下AAI对不同品系小鼠的急性毒性进行研究,比较不同品系小鼠对AAI的耐受性和急性毒性反应,以期为科学研究AAI提供借鉴和指导。

1 材料

1.1 溶媒及受试物

溶媒:羧甲基纤维素钠(CMC-Na),白色粉末,批号SLBQ8545V,美国Signal Aldrich公司;按要求配制0.5% CMC-Na水溶液,其用量随配制体积的变化同比例调整,混悬后贴好标签并置于4℃冰箱备用。受试物:AAI,黄色固体粉末,批号110746-201611,中国食品药品检定研究院提供,按照给药需求以溶媒分别配制不同浓度的AAI,充分混匀后贴标签,置于4℃冰箱保存。

1.2 实验动物

SPF级C57BL/6和C3H/HE小鼠各80只(约6周龄),雌雄各半,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号SCXK(京)2016-0006/SCXK(京)2016-0011。动物在恒温20~26℃、恒湿40%~70%、各12h明暗周期的条件下饲养,饲养密度为每笼2~3只。试验期间给予鼠全价颗粒饲料喂养,自由摄食及饮水。本研究的试验方案通过本

单位实验动物福利伦理委员会的伦理审查及批准(伦理审查编号:IACUC-2019-K015)。本研究的设施使用许可证号SYXK(京)2016-0045。

1.3 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);显微成像系统(奥林巴斯DP73-ST-SET)。

2 方法

2.1 动物分组及给药

在检疫驯化最后1d,使用TOXSTAT2006软件按分层随机分组法将C57BL/6和C3H/He小鼠分别分为8组:溶媒对照组和AAI 5.0、9.3、17.1、31.7、58.6、108.4、200.5 mg·kg⁻¹组,每组10只,雌雄各半,采用ig方式给予AAI 1次,给药体积10 mL·kg⁻¹。

2.2 一般症状观察及检测指标

在给药前及给药后15、30 min和1、3 h各进行1次一般症状观察,非给药日每天上午观察1次,记录试验过程中动物的一般症状及死亡情况。动物分别于给药日及给药后第6、8、11、14天各进行1次体质量测定,第14天解剖。

解剖前1d动物禁食过夜,解剖当日ip硫喷妥钠(60 mg·kg⁻¹)麻醉动物,采集腹主动脉血约每只0.5 mL,室温放置约45 min~2 h后,以8 000 r·min⁻¹在室温条件下离心10 min,之后分离血清用于丙氨酸氨基转换酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转换酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、乳酸脱氢酶(LDH)、总胆红素(TBIL)、尿素(UREA)、肌酐(CRE)、血清总胆固醇(TC)和三酰甘油(TG)检测。解剖时记录动物的大体病理学改变,然后摘取脏器称质量。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。所检查组织经10%中性福尔马林缓冲液固定后进行修块取材,然后经逐级酒精脱水、石蜡包埋、轮转切片机切片(厚约3 μm)、经苏木精-伊红(HE)染色后在光镜镜检,进行组织病理学分级^[11]。

2.3 数据统计与处理

对于动物体质量、血清生化指标等数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各给药组与溶媒对照组之间的差异使用 Student's *t* test 进行显著性分析。根据试验结果采用改良寇氏(Käber)法计算各品系小鼠的AAI半数致死量(LD₅₀)及最大耐受剂量(MTD),并对其急性经口毒性进行分析。

3 结果

3.1 整体毒性

3.1.1 一般症状 如表1所示,单次给予C57BL/6小鼠AAI后,31.7、108.4、200.5 mg·kg⁻¹组动物可见消瘦、弓背及活动减少;58.6 mg·kg⁻¹组动物可见消瘦及活动减少。单次给予C3H/He小鼠AAI后,58.6 mg·kg⁻¹组动物可见消瘦及活动减少,108.4、200.5 mg·kg⁻¹组动物可见消瘦、弓背及活动减少。结果表明,C57BL/6小鼠出现上述一般症状的AAI剂量低于C3H/He小鼠。

3.1.2 动物死亡情况 单次给予一定剂量AAI后可导致C57BL/6和C3H/He小鼠出现死亡(表2),C57BL/6小鼠出现死亡的AAI剂量低于C3H/He小鼠,并且在给予相同剂量AAI的情况下,C57BL/6小鼠出现死亡的时间比C3H/He小鼠早。

3.1.3 LD₅₀及MTD 采用Käber法计算本研究中AAI LD₅₀,C57BL/6小鼠的AAI LD₅₀为38.07 mg·kg⁻¹,C3H/He小鼠的AAI LD₅₀为59.92 mg·kg⁻¹。C57BL/6小鼠AAI MTD为17.1 mg·kg⁻¹,C3H/He小鼠的AAI MTD为31.7 mg·kg⁻¹。

3.1.4 体质量变化 与同性别同时间点溶媒对照组雄性或雌性C57BL/6小鼠相比,9.3 mg·kg⁻¹组雄性小鼠的体质量于给药后第8天显著降低($P < 0.05$),17.1 mg·kg⁻¹组雄性小鼠的体质量于给药后第6~14天显著降低($P < 0.01$)。17.1、31.7、

表1 各组C57BL/6和C3H/He小鼠一般症状观察结果($n=10$)

Table 1 Observation results of clinical symptoms in C57BL/6 and C3H/He mice of each group ($n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	C57BL/6 小鼠		C3H/He 小鼠	
		症状	发生率/%	症状	发生率/%
溶媒对照	—	—	100	—	100
AAI	5.0	—	100	—	100
	9.3	—	100	—	100
	17.1	—	100	—	100
31.7	31.7	—	40	—	100
		消瘦	40		
		弓背	10		
58.6	58.6	活动减少	60		
		—	40	—	60
		消瘦	30	消瘦	40
108.4	108.4	活动减少	40	活动减少	40
		—	20	—	10
		消瘦	70	消瘦	30
200.5	200.5	弓背	70	弓背	80
		活动减少	80	活动减少	90
		—	70	—	30
58.6	58.6	消瘦	30	消瘦	70
		弓背	30	弓背	30
		活动减少	30	活动减少	70

“—”表示未见异常。

“—” indicated that no abnormalities were observed.

58.6 mg·kg⁻¹组雌性小鼠的体质量于给药后第6~11天显著降低($P < 0.05, 0.01$);58.6 mg·kg⁻¹组雌性小鼠的体质量于给药后第14天显著降低($P < 0.01$),见图1。

与同性别同时间点溶媒对照组雄性或雌性C3H/He小鼠相比,5 mg·kg⁻¹组雄性小鼠的体质量于给药后第6~11天显著降低($P < 0.01$);9.3、

表2 各组C57BL/6及C3H/He小鼠的死亡情况

Table 2 Death details in C57BL/6 and C3H/He mice of each group

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	C57BL/6 小鼠			C3H/He 小鼠			
		动物数/只	死亡动物/只	死亡时间	动物数/只	死亡动物/只	死亡时间	
溶媒对照	—	10	0	无	10	0	无	
AAI	5.0	10	0	无	10	0	无	
	9.3	10	0	无	10	0	无	
	17.1	10	0	无	10	0	无	
	31.7	10	6	给药后4~8 d	10	0	无	
	58.6	10	6	给药后3~6 d	10	5	给药后6~9 d	
	108.4	10	10	给药后4~5 d	10	10	给药后5~6 d	
	200.5	200.5	10	10	给药后2~4 d	10	10	给药后5~6 d

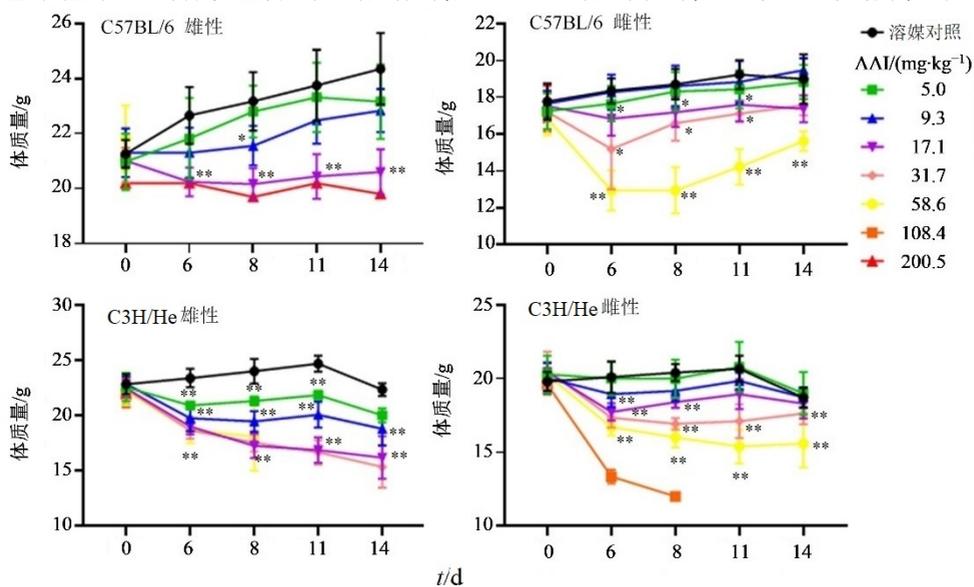
17.1、31.7 mg·kg⁻¹组雄性小鼠的体质量于给药后第6~14天显著降低($P < 0.01$)；58.6 mg·kg⁻¹组雄性小鼠的体质量于给药后第6~8天显著降低($P < 0.01$)。17.1、31.7、58.6 mg·kg⁻¹组雌性小鼠的体质量于给药后第6~8天显著降低($P < 0.01$)；31.7、58.6 mg·kg⁻¹组雌性小鼠的体质量分别于给药后第

11~14天显著降低($P < 0.01$)。

3.2 血清生化指标检测

如表3所示,给药后第14天,与溶媒对照组C57BL/6小鼠相比,各组C57BL/6小鼠血液生化指标均未见异常,统计学无显著性差异。

给药后第14天,与溶媒对照组C3H/He



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs vehicle control group.

图1 给予不同剂量AAI后C57BL/6和C3H/He小鼠体质量变化情况($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 1 Changes on body weight in C57BL/6 and C3H/He mice after administration with different doses of AAI ($\bar{x} \pm s, n=5$)

表3 AAI致C57BL/6和C3H/He小鼠血清生化指标变化情况($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 AAI-induced changes of serum biochemical indicators in C57BL/6 and C3H/He mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg· kg ⁻¹)	C57BL/6 小鼠								
		ALT/ (U·L ⁻¹)	AST/ (U·L ⁻¹)	ALP/ (U·L ⁻¹)	LDH/ (U·L ⁻¹)	TBIL/ (μmol·L ⁻¹)	UREA/ (mmol·L ⁻¹)	CRE/ (μmol·L ⁻¹)	TC/ (mmol·L ⁻¹)	TG/ (mmol·L ⁻¹)
溶媒对照	—	21±3	39±7	138±16	375±137	2.63±0.72	8.5±1.3	11±2	1.91±0.36	0.69±0.16
AAI	5.0	24±11	41±17	135±13	384±112	2.88±0.94	7.8±1.0	11±2	1.82±0.29	0.69±0.12
	9.3	21±6	37±7	135±23	321±74	2.69±0.49	9.5±5.6	13±10	1.91±0.30	0.65±0.16
	17.1	19±5	37±5	130±31	327±208	2.38±0.67	12.5±6.8	19±10	2.09±0.29	0.63±0.12
	31.7	24±3	41±3	149±55	286±63	2.15±0.77	9.7±5.3	14±7	1.72±0.30	0.55±0.09
	58.6	28±8	18±2	213±24	276±22	1.77±0.13	22.7±7.8	31±12	2.04±0.01	0.54±0.04
组别	剂量/ (mg· kg ⁻¹)	C3H/He 小鼠								
		ALT/ (U·L ⁻¹)	AST/ (U·L ⁻¹)	ALP/ (U·L ⁻¹)	LDH/ (U·L ⁻¹)	TBIL/ (μmol·L ⁻¹)	UREA/ (mmol·L ⁻¹)	CRE/ (μmol·L ⁻¹)	TC/ (mmol·L ⁻¹)	TG/ (mmol·L ⁻¹)
溶媒对照	—	24±14	49±6	160±30	448±146	2.56±0.71	9.3±1.8	10±2	3.26±0.37	0.81±0.14
AAI	5.0	31±15	80±79	166±19	382±79	2.32±0.24	8.1±1.1	10±2	3.75±0.64	0.98±0.24
	9.3	38±18	67±20	181±16	298±67	2.10±0.32	14.0±9.7	14±5	3.93±0.90	0.90±0.27
	17.1	46±26*	86±39**	179±14	279±52*	1.93±0.45	41.5±41.8	26±19	3.95±0.67	0.79±0.18
	31.7	54±27**	110±64**	175±27	273±68*	1.52±0.30**	50.0±46.5	31±26**	4.10±0.78	0.92±0.34
	58.6	50±7**	68±25	161±28	202±81**	1.51±0.34**	12.6±6.1	11±5	2.89±1.34	0.76±0.37

与同种小鼠溶媒对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs vehicle control group in same mice.

小鼠相比,17.1、31.7、58.6 mg·kg⁻¹组动物丙氨酸氨基转移酶(ALT)显著升高($P < 0.05$ 、 0.01);17.1、31.7 mg·kg⁻¹组天冬氨酸氨基转移酶(AST)均明显升高($P < 0.01$);17.1、31.7、58.6 mg·kg⁻¹组乳酸脱氢酶(LDH)显著降低($P < 0.05$ 、 0.01);31.7、58.6 mg·kg⁻¹组总胆红素(TBIL)明显降低($P < 0.01$);31.7 mg·kg⁻¹组肌酐(CRE)明显升高($P < 0.01$)。以上各项血清生化指标的变化情况提示,给予一定剂量的AAI可引起C3H/He小鼠肝脏和肾脏损伤。

3.3 大体病理学检查结果

各组C57BL/6小鼠与给予AAI有关的大体病理学改变主要为胸腺体积减小、胸腺消失、肝脏灰白色斑块、脾脏体积减小及灰白色斑块,肾脏颜色改变及灰白色斑块。各组C3H/He小鼠与给予AAI有关的大体病理学改变主要是胸腺体积减小、胸腺消失、脾脏体积减小、肝脏灰白色斑块、肾脏颜色改变、灰白色斑块、暗红色斑点及表面颗粒状凸起。各AAI剂量组的C57BL/6和C3H/He小鼠所见上述大体病变的发生情况见表4。

3.4 组织病理学检查结果

3.4.1 胸腺 单次给予不同剂量AAI后,31.7、58.6、108.4、200.5 mg·kg⁻¹组C57BL/6小鼠胸腺镜检可见轻度至中度皮质淋巴细胞减少,并且上述各组分别有1、1、1、3只动物胸腺镜检未见。58.6、108.4、200.5 mg·kg⁻¹组C3H/He小鼠胸腺镜检可见中度至重度皮质淋巴细胞减少,并且9.3、17.1、58.6、108.4、200.5 mg·kg⁻¹组分别有1、4、5、9、8、8只动物胸腺镜检未见,而溶媒对照组C57BL/6及C3H/He小鼠胸腺均未见上述病变(表5及图2、3)。以上结果提示,单次给予不同剂量的AAI可引起C57BL/6、C3H/He小鼠胸腺皮质淋巴细胞减少,甚至胸腺完全消失,并且C3H/He小鼠出现胸腺消失的AAI剂量低于C57BL/6小鼠。

3.4.2 脾脏 单次给予不同剂量的AAI后,31.7、58.6、108.4、200.5 mg·kg⁻¹组C57BL/6小鼠脾脏可见极轻度至中度骨髓淋巴细胞减少;17.1、58.6、108.4、200.5 mg·kg⁻¹组C3H/He小鼠脾脏也可见轻度至中度骨髓淋巴细胞减少,而溶媒对照组C57BL/6和C3H/He小鼠脾脏均未见上述病变(表5及图2、3)。

表4 大体病理学检查结果(n=10)
Table 4 Macroscopic observations(n=10)

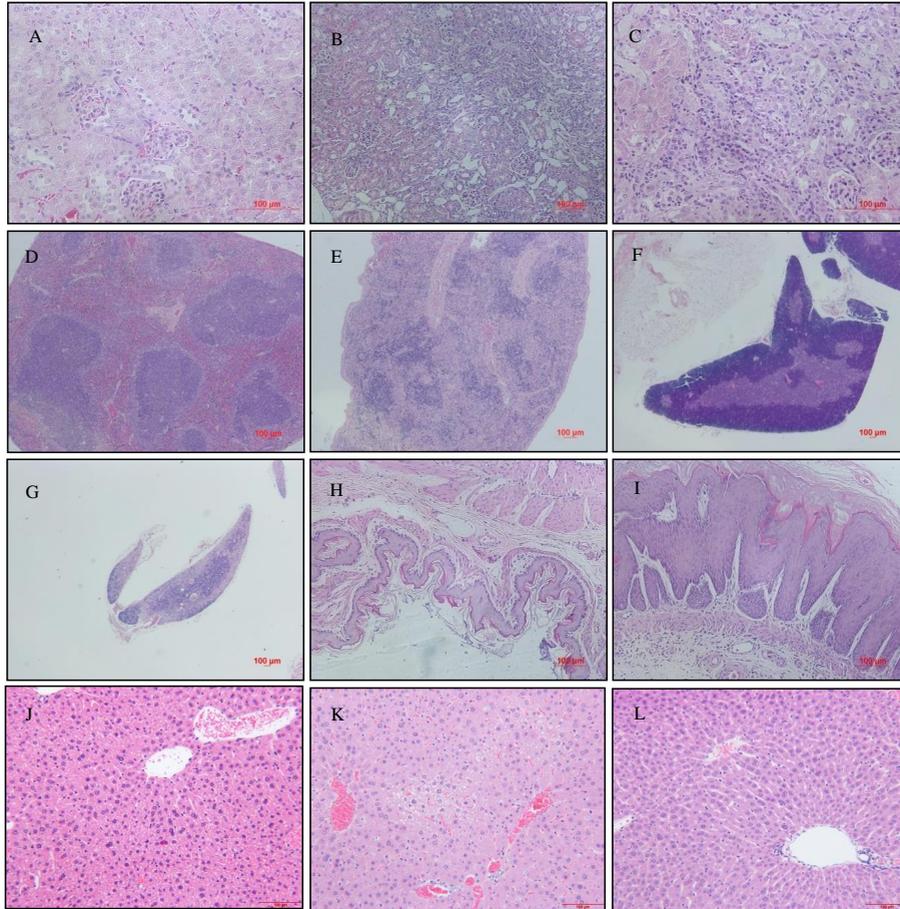
组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	C57BL/6小鼠胸腺/只		C57BL/6小鼠肝脏	C57BL/6小鼠脾脏/只		C57BL/6小鼠肾脏/只			
		体积减小	消失	灰白色斑块/只	体积减小	灰色斑块	灰色斑块	暗红色斑点	颜色改变	表面颗粒状凸起
溶媒对照	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAI	5.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	17.1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
	31.7	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	58.6	1	1	0	4	0	1	0	1	0
	108.4	2	1	0	9	0	0	0	0	0
	200.5	0	2	4	5	1	2	0	0	0
组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	C3H/He小鼠胸腺/只		C3H/He小鼠肝脏	C3H/He小鼠脾脏/只		C3H/He小鼠肾脏/只			
		体积减小	消失	灰白色斑块/只	体积减小	灰色斑块	灰色斑块	暗红色斑点	颜色改变	表面颗粒状凸起
溶媒对照	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAI	5.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9.3	0	1	0	0	0	0	0	1	0
	17.1	0	5	0	1	0	0	0	4	2
	31.7	1	5	0	3	0	0	0	3	0
	58.6	1	9	0	3	0	1	3	0	0
	108.4	1	9	0	10	0	0	4	0	0
	200.5	0	7	3	7	0	0	1	0	0

表 5 组织病理学检查结果
Table 5 Microscopic observations

组别	剂量/ (mg· kg ⁻¹)	肾小管变性			肾小管变性/坏死				肾小管 坏死	肾小管 扩张		肾脏透明管型			肾脏皮质和/或髓质,炎 症细胞浸润		
		+	++	+++	+	++	+++	++++	+++	+	++	+	++	+++	+	++	+++
溶媒对 照(C57 BL/6)	—	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AAI (C57B L/6)	5.0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	9.3	3	5	1	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0
	17.1	1	2	0	0	7	1	0	0	2	2	1	0	0	3	4	0
	31.7	0	2	1	0	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
	58.6	0(9)	0(9)	0(9)	0(9)	0(9)	9(9)	0(9)	0(9)	0(9)	1(9)	0(9)	1(9)	0(9)	0(9)	0(9)	4(9)
	108.4	0	0	0	0	2	3	0	5	0	0	0	5	0	0	0	0
	200.5	0(3)	0(3)	0(3)	0(3)	0(3)	3(3)	0(3)	0(3)	0(3)	0(3)	0(3)	0(3)	2(3)	0(3)	0(3)	0(3)
溶媒对 照(C3H /He)	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAI (C3H/ He)	5.0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0
	9.3	1	0	0	0	3	2	0	0	0	1	0	5	0	5	0	0
	17.1	1	0	0	4	0	5	0	0	0	1	0	3	2	5	0	0
	31.7	0	1	0	0	4	3	2	0	0	0	3	1	4	5	0	0
	58.6	0	0	0	0	3	2	5	0	0	2	3	2	4	5	0	0
	108.4	0(9)	0(9)	0(9)	0(9)	0(9)	0(9)	9(9)	0(9)	0(9)	0(9)	0(9)	0(9)	5(9)	1(9)	0(9)	0(9)
	200.5	0(7)	0(7)	0(7)	0(7)	0(7)	2(7)	5(7)	0(7)	0(7)	0(7)	1(7)	0(7)	1(7)	0(7)	0(7)	0(7)
组别	剂量/ (mg· kg ⁻¹)	肾脏矿化			胸腺皮质,淋巴细 胞减少			胸腺 镜检 未见	脾脏白髓,淋巴细胞 数目减少			前胃,鳞状细 胞增生		肝细胞空泡 变性	肝细胞 肿胀	肝细胞变 性/坏死	
溶媒对 照(C57 BL/6)	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAI (C57B L/6)	5.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	17.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	31.7	0	0	0	0	3	1	1	0(9)	1(9)	2(9)	0(5)	0(5)	0	0	0	0
	58.6	0(9)	0(9)	0(9)	1(9)	3(9)	0(9)	1(9)	0(8)	1(8)	2(8)	0(4)	3(4)	2	1	0	0
	108.4	0	0	0	0	9	0	1	0(8)	8(8)	0(8)	0(5)	0(5)	1	0	8	0
	200.5	0(3)	0(3)	0(3)	0	7	0	3	1(6)	1(6)	4(6)	0(0)	0(0)	0	0	10	0
溶媒对 照(C3H /He)	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AAI (C3H/ He)	5.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9.3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0						
	17.1	1	2	2	0	0	0	4	0	1	0	2	0	0	0	0	0
	31.7	3	0	5	0	0	0	5	0	0	0	1	8	1	4	0	0
	58.6	2	5	1	0	1	0	9	0(9)	1(9)	3(9)	4(7)	3(7)	2	1	0	0
	108.4	0(9)	1(9)	4(9)	0	1	1	8	0(9)	2(9)	7(9)	0(0)	0(0)	2	3	10	4
	200.5	0(7)	2(7)	2(7)	0	2	0	8	0(8)	3(8)	5(8)	0(0)	0(0)	0	0	10	2

“+”表示轻微改变;“++”表示轻度改变;“+++”表示中度改变;“++++”表示重度改变;数据中的括号内为统计总样本数,没括号的为n=10。

“+” indicates minimal changes; “++” indicates mild changes; “+++” indicates moderate changes; “++++” indicates severe change. The parentheses in the data indicate the total number of statistical samples, and n=10 without parentheses.



溶媒对照组动物肾脏(A, $\times 200$)、脾脏(D, $\times 40$)、胸腺(F, $\times 20$)、前胃(H, $\times 100$)及肝脏(J, $\times 200$)未见明显的组织病理学改变;给予AAI导致肾脏肾小管变性、扩张及炎性细胞浸润(B, $\times 100$),肾小管变性/坏死及炎性细胞浸润(C, $\times 200$),脾脏白髓淋巴细胞减少(E, $\times 40$),胸腺皮质淋巴细胞减少(G, $\times 20$),前胃鳞状细胞增生(I, $\times 100$),肝脏肝细胞空泡变性(K, $\times 200$)和肝细胞肿胀(L, $\times 200$)。

The kidney (A, $\times 200$), spleen (D, $\times 40$), thymus (F, $\times 20$), forestomach (H, $\times 100$), and liver (J, $\times 200$) of vehicle control group animals showed no obvious histopathological changes; however, AAI administration resulted in tubular degeneration, dilation, and infiltration of inflammatory cells in the kidney (B, $\times 100$), tubular degeneration/necrosis and infiltration of inflammatory cells (C, $\times 200$), decreased cellularity of lymphocytes in the white pulp of the spleen (E, $\times 40$), decreased cellularity of lymphocytes in the cortex of the thymus (G, $\times 20$), hyperplasia of squamous cells in the forestomach (I, $\times 100$), vacuolization of hepatocytes and hepatocyte swelling in the liver (K, $\times 200$), and hepatocyte vacuolization (L, $\times 200$).

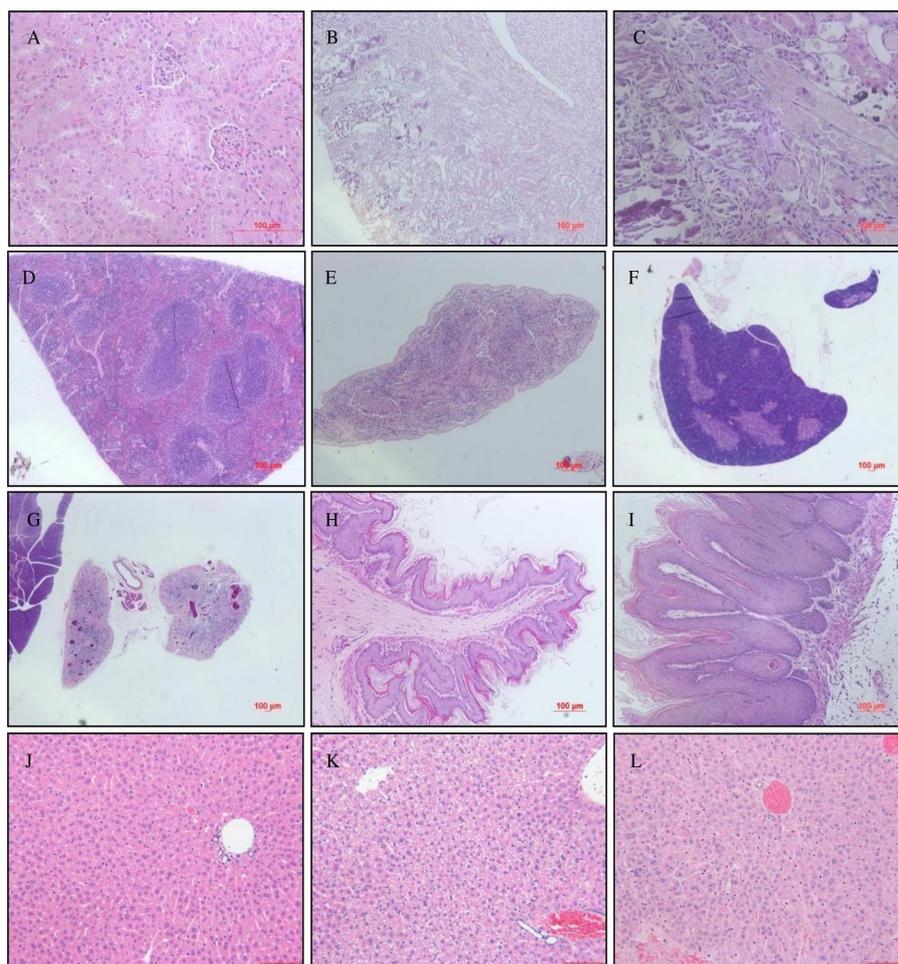
图2 AAI致C57BL/6小鼠各组织器官的组织病理学改变

Fig. 2 Histopathological changes of tissues and organs in C57BL/6 mice induced by AAI

以上结果提示单次给予不同剂量的AAI可导致C57BL/6、C3H/He小鼠脾脏白髓淋巴细胞减少,并且C3H/He小鼠出现脾脏白髓淋巴细胞减少的AAI剂量低于C57BL/6小鼠。

3.4.3 肾脏 单次给予不同剂量的AAI后,5.0、9.3、17.1、31.7 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组C57BL/6小鼠肾脏可见极轻度至中度肾小管变性;17.1、31.7 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组可见轻度至中度肾小管变性/坏死;108.4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组可见中度肾小管坏死;9.3、17.1、58.6 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组可见极轻度至轻度肾小管扩张;5.0、17.1、58.6、108.4、200.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组肾脏可见极轻度至中度蛋白管型;17.1、31.7、58.6 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组肾脏可见极轻度至中度皮质/髓质炎症细胞浸润。溶媒对照组肾脏可见极轻度肾小管变性和极轻度蛋白管型(表5、图2)。

单次给予不同剂量的AAI后,各组C3H/He小鼠肾脏可见不同程度的肾小管变性或变性/坏死;17.1、31.7、58.6、108.4、200.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组肾脏可见肾小管矿化;9.3、17.1、58.6 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组肾脏可见轻度肾小管扩张;9.3、17.1、31.7、58.6、108.4、200.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组肾脏可见极轻度至中度蛋白管型;9.3、17.1、31.7、58.6、108.4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组肾脏可见极轻度皮质和/或髓质炎症细胞浸润。溶媒对照组肾脏未见上述病变(表5、图3)。由上述镜检结果可知,单次给予不同剂量的AAI可引起C57BL/6和C3H/He小鼠肾脏严重损伤,除了肾小管矿化,2种品系小鼠肾脏所见其他病变类型基本相似,并且C3H/He小鼠肾脏出现肾小管变性和/或坏死、蛋白管型病变的AAI剂量低于C57BL/6小鼠。



溶媒对照组动物肾脏(A, ×200)、脾脏(D, ×40)、胸腺(F, ×20)、前胃(H, ×100)及肝脏(J, ×200)未见明显的组织病理学改变;给予AAI导致肾脏肾小管变性/坏死、扩张、矿化、蛋白管型及炎性细胞浸润(B, ×100),高倍镜下可见肾小管变性、坏死、矿化及炎性细胞浸润(C, ×200),脾脏白髓淋巴细胞减少(E, ×40),胸腺皮质淋巴细胞减少(G, ×20),前胃鳞状细胞增生(I, ×100),以及肝脏肝细胞空泡变性(K, ×200)、肝细胞肥大(K, L, ×200)和肝细胞坏死(L, ×200)。

The kidney (A, ×200), spleen (D, ×40), thymus (F, ×20), forestomach (H, ×100), and liver (J, ×200) of vehicle control group animals showed no obvious histopathological changes; however, AAI administration resulted in tubular degeneration/necrosis, dilation, mineralization, protein casts, and infiltration of inflammatory cells in the kidneys (B, ×100), with tubular degeneration, necrosis, mineralization, and infiltration of inflammatory cells visible at high power (C, ×200). The white pulp of the spleen showed decreased cellularity of lymphocytes (E, ×40), the cortex of the thymus showed decreased cellularity of lymphocytes (G, ×20), the forestomach showed hyperplasia of squamous cell (I, ×100), and the liver showed vacuolization of hepatocytes (K, ×200), hepatocyte hypertrophy (K, L, ×200), and hepatocyte necrosis (L, ×200).

图3 AAI致C3H/He小鼠各组织器官的组织病理学改变

Fig. 3 Histopathological changes of tissues and organs in C3H/He mice induced by AAI

3.4.4 前胃 AAI 31.7、58.6 mg·kg⁻¹组 C57BL/6 小鼠前胃均出现轻度鳞状细胞增生(表5、图2)。17.1、31.7、58.6 mg·kg⁻¹组 C3H/He 小鼠前胃出现极轻度至轻度鳞状细胞增生(表5、图3)。由于108.4、200.5 mg·kg⁻¹组动物死亡及胃组织自溶,因而未观察到上述2组 C57BL/6、C3H/He 小鼠前胃的病理改变。以上结果提示,单次给予一定剂量的AAI可导致 C57BL/6、C3H/He 小鼠前胃出现鳞状细胞增生,并且引起 C3H/He 小鼠出现前胃鳞状细胞增生的 AAI剂量低于 C57BL/6 小鼠。

3.4.5 肝脏 单次给予不同剂量的 AAI 可导致

58.6、108.4 mg·kg⁻¹组 C57BL/6 小鼠肝脏发生极轻度至轻度肝细胞空泡变性,同时可导致108.4、200.5 mg·kg⁻¹组 C57BL/6 小鼠肝脏肝细胞肿胀。单次给予 AAI 也可导致 31.7、58.6、108.4、200.5 mg·kg⁻¹组 C3H/He 小鼠肝脏极轻度至轻度肝细胞空泡变性,以及108.4、200.5 mg·kg⁻¹组动物肝脏肝细胞肿胀及变性/坏死(表5),而溶媒对照组 C57BL/6、C3H/He 小鼠肝脏均未见明显异常。以上结果提示单次给予不同剂量的 AAI 可引起 C57BL/6 及 C3H/He 小鼠均出现肝脏损伤,并且 C3H/He 小鼠出现肝脏损伤的 AAI 剂量低于 C57BL/6

小鼠。

4 讨论

4.1 整体毒性

有关 AAs 致动物毒性的试验报道很多, Sato 等^[12]报道给予 AAs 后第 7 天, BALB/c、C3H/He 小鼠体质量较首次给予 AAs 时的减轻, 并且在第 28 天时, 20% 的 BALB/c 小鼠因肾功能不全死亡; 而首次给予 AAs 后, C57BL/6 小鼠体质量逐渐增加; 在第 5 次给予 AAs 后, C3H/He 和 C57BL/6 小鼠的体质量均略有增加, 而 BALB/c 小鼠的体质量在给药后持续降低。相关研究结果^[13-14]还显示, Wistar 大鼠和 NMRI 小鼠经口给予 AAs 的 LD₅₀ 范围在 56~203 mg·kg⁻¹, 而静脉给予 AAs 的 LD₅₀ 范围在 38~83 mg·kg⁻¹, 由此可见 AAs 的 LD₅₀ 范围与动物的品系和性别具有相关性。在本研究中, 单次给予一定剂量的 AAI 后, C57BL/6 和 C3H/He 小鼠均可见明显的一般症状, 如消瘦、弓背和活动减少(表 1), 且 C57BL/6 小鼠出现上述一般症状的 AAI 剂量低于 C3H/He 小鼠; 不同剂量 AAI 引起 C57BL/6 小鼠体质量变化呈先大幅下降(给药后第 6、8 天)而后逐渐恢复或完全恢复的趋势(给药后第 11、14 天); 不同剂量 AAI 同样可引起 C3H/He 雄性和/或雌性小鼠体质量下降, 基本上表现为随 AAI 剂量增加和时间延长而体质量下降更加明显的趋势。另外, 本研究中根据软件推算的 C57BL/6 和 C3H/He 小鼠的 AAI LD₅₀ 在相关研究报道的范围之内^[13-14], 并且 C57BL/6 小鼠的 AAI LD₅₀ 与先前有关 ICR 小鼠 AAI LD₅₀ 相近^[15]。

4.2 组织病理学改变

4.2.1 胸腺及脾脏

Mengs^[5]的研究显示, ig 给予 200 mg·kg⁻¹ AAs 可引起大鼠的淋巴器官如脾脏、胸腺及淋巴结的淋巴细胞呈剂量相关性耗减。在本研究中, 单次给予不同剂量的 AAI 引起 C57BL/6 和 C3H/He 小鼠胸腺主要的病理学改变为不同程度的皮质淋巴细胞减少, 以及胸腺消失; 脾脏的主要病理学改变为不同程度骨髓淋巴细胞数目减少, 并且胸腺和脾脏的病理改变与 Mengs 的报道一致。结合死亡动物的胸腺及脾脏的大体及组织病理学改变考虑 C57BL/6 和 C3H/He 小鼠胸腺、脾脏的病理学改变为给予 AAI 后免疫系统产生应激反应所致, 但也不排除 AAI 对免疫系统的直接毒性作用。

4.2.2 肾脏 相关研究表明, AAI 诱导的肾脏毒性在早期以急性肾小管上皮细胞坏死为特征, 后期多见间质炎症细胞浸润, 并伴有肾小管萎缩

和肾间质纤维化^[16-18]。每日 sc 给予雄性缺盐 Wistar 大鼠 10 mg·kg⁻¹ AAs (40% AAI 和 60% AAI), 连续给药 35 d 后可见马兜铃酸肾病(AAN), 表现为肾小管坏死、淋巴细胞浸润、肾小管萎缩伴间质纤维化^[18]。给予纯化的 AAI 和 AAI 均可起肾脏的病理改变, 但 AAI 处理的 C3H/He 和 BALB/c 小鼠均可观察到严重的肾小管坏死, 而 AAI 仅可导致肾脏局灶性轻度间质病变^[12-14]。虽然近 30 年来各实验室研究人员对 AAs、AAI 及 AAI 的急、慢性毒性的研究颇多, 但所研究的剂量范围较为局限, 未能体现单次给药急性毒性试验中不同剂量 AAI 所引起肾脏病变的显著剂量-效应关系和病变类型。在本研究中, 各 AAI 剂量组中 C57BL/6 和 C3H/He 小鼠肾脏的病变类型随 AAI 剂量增加而不同, 且相同类型的病变随 AAI 剂量增加而病变程度逐渐加重。给予 C57BL/6 和 C3H/He 小鼠相同剂量的 AAI 所引起肾脏的病变类型也不一样, 如在 C3H/He 小鼠中可观察到肾小管矿化, 而在 C57BL/6 小鼠肾脏未观察到该病变。

4.2.3 肝脏 Zhou 等^[19]的研究表明给予 30 mg·kg⁻¹ AAI 1~2 周后可引起大鼠肝脏肝细胞弥漫性肿胀及空泡变性, 停药 1 周后肝脏损伤可缓解, 并且具有一定的可逆性。在本研究中, AAI 致 C57BL/6 和 C3H/He 小鼠肝脏的主要病理改变是肝细胞肿胀、空泡变性及肝细胞变性/坏死, 与文献报道的研究结果相似, 并且导致 C3H/He 小鼠肝细胞损伤的 AAI 剂量低于 C57BL/6 小鼠。从本研究的结果来看, 引起肝脏损伤的 AAI 剂量远高于肾脏, 提示肾脏对 AAI 的急性毒性更敏感。

4.2.4 前胃 Mengs^[20]的报道显示, 每日 ig 给予 10 mg·kg⁻¹ AAs (77.24% AAI 和 22.18% AAI) 可导致大鼠前胃鳞状细胞出现广泛坏死, 随后出现再生和增生, 以及鳞状细胞乳头状瘤形成, 最终发展为浸润性鳞状细胞癌。Pu 等^[21]的研究结果也显示, 分别给予 30、60、90 mg·kg⁻¹ AAI 后第 12 天, 大鼠前胃可出现溃疡和明显的鳞状细胞增生和过度角化, 上述病理改变的严重程度具有明显的剂量相关性, 而且 AAI 对胃的损伤只发生于前胃。本研究的结果也证实, 单次给予一定剂量的 AAI 可导致 C57BL/6、C3H/He 小鼠前胃出现鳞状细胞增生, 并且 C3H/He 小鼠出现前胃鳞状细胞增生的 AAI 剂量低于 C57BL/6 小鼠。

4.3 动物死亡原因及 2 种小鼠对 AAI 的敏感性分析

本研究中多个 AAI 剂量组均可见 2 个品系小鼠

死亡,而且各组死亡动物数和动物死亡时间均呈现剂量-效应相关性,并且导致C57BL/6小鼠死亡的AAI剂量低于C3H/He小鼠(表2)。C57BL/6小鼠各组死亡动物(最低AAI剂量为 $17.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)镜检共同特征为脾脏中度白髓淋巴细胞减少,胸腺中度到重度皮质淋巴细胞数量减少,甚至消失未见。除了发生组织自溶的脏器,其他脏器未见与动物死亡相关的组织病理学改变,因而考虑导致C57BL/6小鼠死亡直接原因为单次大剂量给予AAI对动物造成严重给药应激所致,也不排除AAI对免疫系统的直接毒性作用导致动物死亡。对于C3H/He小鼠(最低AAI剂量为 $58.6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),所有死亡动物除了可见脾脏轻度至中度白髓淋巴细胞减少,胸腺中度皮质淋巴细胞减少,以及消失未见外,还可见肾脏出现严重损伤(肾小管中度至重度变性/坏死等与给予AAI相关的病变),因而考虑C3H/He小鼠的死亡因给予大剂量AAI造成的严重应激损伤和AAI对动物造成严重肾脏损伤共同导致。同时,有研究报道给予AAs后,BALB/c和C3H/He小鼠比C57BL/6小鼠更容易产生肾毒性作用。也有文献指出,C3H/He和BALB/c小鼠对AAI较C57BL/6小鼠敏感,体现在肾脏的形态学、血清生化指标,以及尿液指标^[10-12]。结合上述动物死亡原因分析、动物体质量变化结果、一般症状观察结果(表2),存活动物的血清生化检测结果(表3)和镜检结果(表5),考虑C57BL/6小鼠对AAI急性毒性的敏感性低于C3H/He小鼠。

本研究就AAI对不同品系小鼠的整体毒性进行了检测,并推算出AAI的 LD_{50} 及MTD,还对2种小鼠的死亡原因和对不同剂量AAI的敏感性进行研究分析。本研究的结果显示,肾脏是AAI最早损伤的脏器,并且2个品系小鼠肾脏的病理学改变有相似之处也有不同表现;单次给予大量的AAI不会导致肝脏严重损伤,并且肝脏也不是AAI急性毒性的主要严重受累脏器;单次给予大剂量的AAI不会引起成年C57BL/6、C3H/He小鼠肾脏、肝脏及前胃等脏器的肿瘤性病变,但可以导致C57BL/6、C3H/He小鼠前胃出现癌前病变,即前胃鳞状细胞增生。另外,结合一般症状观察、动物死亡情况及死亡原因分析、血清生化指标检测,以及病理学检查结果,综合分析认为C3H/He小鼠对AAI的敏感性高于C57BL/6小鼠。总之,本研究对不同剂量水平的AAI致C57BL/6及C3H/He小鼠的整体毒性和器官毒性进行了较为系统的研究,阐明了AAI引起各

脏器的急性毒性特点,并且对比研究了不同品系小鼠对AAI的敏感性,为更加科学、合理研究AAI的毒性及毒性机制提供丰富的基础数据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 邵鑫,张月,郑雁雪,等. 中药中马兜铃酸快速检测及分离技术研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(19): 6200-6212.
Shao X, Zhang Y, Zheng Y X, et al. Research progress on rapid detection and separation techniques of aristolochic acids in traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(19): 6200-6212.
- [2] Luciano R L, Perazella M A. Aristolochic acid nephropathy: Epidemiology, clinical presentation, and treatment [J]. Drug Saf, 2015, 38(1): 55-64.
- [3] Anger E E, Yu F, Li J. Aristolochic acid-induced nephrotoxicity: Molecular mechanisms and potential protective approaches [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(3): 1157.
- [4] Shibutani S, Dong H, Suzuki N, et al. Selective toxicity of aristolochic acids I and II [J]. Drug Metab Dispos, 2007, 35(7): 1217-1222.
- [5] Mengs U. Acute toxicity of aristolochic acid in rodents [J]. Arch Toxicol, 1987, 59(5): 328-331.
- [6] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene [J]. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 2002, 82: 1-556.
- [7] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Pharmaceuticals. Volume 100 A. A review of human carcinogens [J]. Iarc Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012, 100 (PT A):892-896.
- [8] Lebeau C, Arlt V M, Schmeiser H H, et al. Aristolochic acid impedes endocytosis and induces DNA adducts in proximal tubule cells [J]. Kidney Int, 2001, 60(4): 1332-1342.
- [9] Li X W, Yokota S, Wang D, et al. Localization of aristolochic acid in mouse kidney tissues by immunohistochemistry using an anti-AA-I and AA-II monoclonal antibody [J]. Am J Chin Med, 2014, 42(6): 1453-1469.
- [10] Program N T. Final report on carcinogens background document for aristolochic acids [J]. Rep Carcinog Backgr Doc, 2008, Sep:(8-5976): i-xxv, 1-246.
- [11] Shackelford C, Long G, Wolf J, et al. Qualitative and quantitative analysis of nonneoplastic lesions in

- toxicology studies [J]. Toxicol Pathol, 2002, 30(1):93-96
- [12] Sato N, Takahashi D, Chen S M, et al. Acute nephrotoxicity of aristolochic acids in mice [J]. J Pharm Pharmacol, 2004, 56(2): 221-229.
- [13] Mengs U, Stotzem C D. Toxicity of aristolochic acid - a subacute study in male rats [J]. Med Sci Res, 1992, 20: 223-224.
- [14] Cosyns J P, Dehoux J P, Guiot Y, et al. Chronic aristolochic acid toxicity in rabbits: A model of Chinese herbs nephropathy? [J]. Kidney Int, 2001, 59(6): 2164-2173.
- [15] 丁晓霜, 梁爱华, 王金华, 等. 关木通及其马兜铃总酸对小鼠肾脏毒性的研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(13): 1019-1022.
- Ding X S, Liang A H, Wang J H, et al. Nephrotoxicity of *Aristolochia manshuriensis* and aristolochic acids in mice [J]. China J Chin Mater Med, 2005, 30(13): 1019-1022.
- [16] Stefanovic V, Jelakovic B, Cukuranovic R, et al. Diagnostic criteria for Balkan endemic nephropathy: Proposal by an international panel [J]. Ren Fail, 2007, 29 (7): 867-880.
- [17] Jelaković B, Nikolić J, Radovanović Z, et al. Consensus statement on screening, diagnosis, classification and treatment of endemic (Balkan) nephropathy [J]. Nephrol Dial Transplant, 2014, 29(11): 2020-2027.
- [18] Debelle F D, Nortier J L, De Prez E G, et al. Aristolochic acids induce chronic renal failure with interstitial fibrosis in salt-depleted rats [J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(2): 431-436.
- [19] Zhou J Y, Yang Y F, Wang H J, et al. The disturbance of hepatic and serous lipids in aristolochic acid I induced rats for hepatotoxicity using lipidomics approach [J]. Molecules, 2019, 24(20): 3745.
- [20] Mengs U. On the histopathogenesis of rat forestomach carcinoma caused by aristolochic acid [J]. Arch Toxicol, 1983, 52(3): 209-220.
- [21] Pu X Y, Shen J Y, Deng Z P, et al. Oral exposure to aristolochic acid I induces gastric histological lesions with non-specific renal injury in rat [J]. Exp Toxicol Pathol, 2016, 68(6): 315-320.

[责任编辑 兰新新]