

• 药理与临床 •

海藻-甘草反药配伍致大鼠肾毒性的机制探讨

孟 娟^{1,3}, 伍振辉^{1,3}, 彭蕴茹^{1,2*}, 沈明勤^{1,3*}

1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028

2. 江苏省方剂高技术研究重点实验室/江苏省中药资源产业化过程协同创新中心(南京中医药大学), 江苏 南京 210023

3. 江苏省中医药研究院, 江苏 南京 210028

摘要:目的 探索海藻-甘草反药配伍致大鼠肾毒性的内在机制。方法 大鼠随机分为对照组、海藻组、甘草组、海藻-甘草配伍组, 经过连续 ig 给药 4 周的多次给药毒性实验, 检测血清中尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)、醛固酮、皮质醇及电解质水平, 并进行肾脏组织病理学检查; 用 UPLC-TQ/MS 法同时检测甘草中的 6 种主要成分在肾组织的分布情况; Western blotting 法检测 11 β -类固醇脱氢酶(HSD11B2)在肾组织中的蛋白表达水平。结果 与对照组相比, 海藻组大鼠的血清生化指标无明显变化, 甘草组的血清中醛固酮水平显著降低($P < 0.05$), BUN、Scr 显著升高($P < 0.01$); 海藻-甘草组的血清中醛固酮、K⁺、Cl⁻水平显著降低($P < 0.05$ 、0.01), 而 BUN、Scr、皮质醇水平显著升高($P < 0.05$ 、0.01)。病理组织学检查表明, 甘草组大鼠的肾脏组织有轻微的炎细胞浸润, 海藻-甘草组有明显的炎细胞浸润并伴有蛋白管型。海藻-甘草组大鼠的肾脏组织中的甘草次酸分布明显高于甘草组($P < 0.05$)。与对照组相比, 甘草组、海藻-甘草组大鼠的肾组织 HSD11B2 蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$ 、0.01), 而海藻-甘草组更为显著。结论 通过增加甘草次酸在大鼠肾脏组织的积蓄, 抑制肾脏组织中的 HSD11B2 的表达, 造成醛固酮-皮质醇系统紊乱, 可能是海藻-甘草反药组合产生肾毒性的主要机制。

关键词: 海藻-甘草配伍; 肾脏; 毒性; 甘草次酸; 11 β -类固醇脱氢酶; 电解质

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)09-2076-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.09.015

Toxicological mechanisms of compatibility application of *Sargassum pallidum*-*Glycyrrhiza uralensis* on kidney in rats

MENG Xian^{1,3}, WU Zhen-hui^{1,3}, PENG Yun-ru^{1,2}, SHEN Ming-qin^{1,3}

1. Nanjing Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Affiliated Hospital, Nanjing 210028, China

2. Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of TCM Formulae and Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

3. Jiangsu Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract: Objective To study the toxicological mechanisms of the compatibility application of *Sargassum pallidum* and *Glycyrrhiza uralensis* on kidney in rats. **Methods** Rats were divided into control, *Sargassum pallidum* (S), *Glycyrrhiza uralensis* (G), and *Sargassum pallidum*-*Glycyrrhiza uralensis* extract (S-G) groups, which were respectively exposed (gavages) for 4 weeks. Then, the levels of blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Scr), aldosterone, cortisol, and electrolytes in rat serum and pathological sections of kidney were detected. Six active contents of *Glycyrrhiza uralensis* in kidney of rats were detected by UPLC-TQ/MS method. The expression of HSD11B2 in kidney was detected by Western blotting. **Results** Compared with the control group, all biochemical indicators of S group had no obvious change. It was found that the level of aldosterone from G group and S-G group was significantly lower than that from control group ($P < 0.05$, 0.01). In contrast to the control group, S. *pallidum*-G. *uralensis* extract led to significantly increased concentration of cortisol, BUN, and Scr in serum ($P < 0.05$, 0.01). The level of K⁺ and Cl⁻ in S-G group was significantly lower than that in control group ($P < 0.05$, 0.01). Pathological examination showed that the G group had mild inflammation infiltration, and a serious inflammatory response accompanied by protein tube was absolved in S-G group. Compared with the G. *uralensis*

收稿日期: 2017-11-03

基金项目: 江苏省方剂高技术研究重点实验室/江苏省中药资源产业化过程协同创新中心资助项目(FJGJS-2015-05)

作者简介: 孟 娟(1993—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药药理学。Tel: (025)52362105 E-mail: swzl_212@163.com

*通信作者 彭蕴茹, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药药理学。Tel: (025)52362105 E-mail: pengyunru@126.com

沈明勤, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药药理学。Tel: (025)52362105 E-mail: mqshen@163.com

extract group, the combination of *S. pallidum* and *G. uralensis* significantly raised the concentration of glycyrrhetic acid (GA) in kidney ($P < 0.05$). When compared to that of control group, there was an inhibited expression of HSD11B2 in the kidney of L group and S-G group. Moreover, the expression of HSD11B2 in S-G group was markedly higher than that in G group ($P < 0.05$). **Conclusion** The toxicity of S-G group was mainly result that increased accumulation of GA, and inhibited the expression of HSD11B2, which resulted the aldosterone-cortisol system disorders.

Key words: *Sargassum pallidum*-*Glycyrrhiza uralensis* compatibility; kidney; toxicity; glycyrrhetic acid; HSD11B2; electrolytes

“十八反”是关于中药配伍禁忌的简单概括,指明部分中药在合用时可能会导致一定的毒副作用。“十八反”作为传统中医药理论的重要组成部分,长期以来对中药的配伍和临床应用起到了一定的指导作用。海藻-甘草反药组合出自十八反中的“藻戟遂芫俱战草”,《中国药典》2015 年版中标明,海藻与甘草不宜同用,但对于其“反”的内在本质,历代医者争议颇多^[1-3]。现今包含海藻和甘草的方剂有海藻玉壶汤、消核散、通气散坚丸等仍应用于临床,用于治疗甲状腺肿大、乳腺增生等。但在一些临床报告中,发现海藻与甘草配伍可能导致腹泻、心悸和水肿等^[4-5]。近年研究发现,甘草和海藻配伍对大鼠的心脏、肝脏和肾脏等器官有一定影响^[6-10],但对于其引发毒性的物质基础尚不明确。为了进一步探索海藻-甘草反药组合致毒增毒的科学内涵,本研究从肾毒性角度出发,进行了连续 ig 给药 4 周的多次给药毒性实验,通过考察大鼠血清中尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)、醛固酮、皮质醇、电解质(Na^+ 、 K^+ 、 Cl^-)水平及肾脏病理组织学变化,检测甘草中 6 种主要成分在肾组织中的浓度变化以及 11 β -类固醇脱氢酶(HSD11B2)在肾组织中的蛋白表达水平,旨在进一步解释海藻-甘草“反”的物质基础,为海藻-甘草的临床用药提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

32 只 SPF 级 SD 大鼠,雄性,体质量(200 $\pm$ 20)g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(沪)2012-0002,饲养于江苏省中医药研究院实验动物中心[合格证号 SYXK(苏)2011-0015],实验前适应性饲养 1 周。

1.2 药物与试剂

甘草购自南京松龄中药饮片公司(产地甘肃,批号 1500907),海藻购自安徽井泉集团中药饮片有限公司(产地山东,批号 20160401),经江苏省中医药研究院钱士辉研究员鉴定,甘草饮片为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的根及根茎,海藻为褐藻门植物海蒿子 *Sargassum pallidum* (Turn.)

C. Ag. 的干燥全体。采用 RP-HPLC 法^[11],测定甘草饮片中的甘草苷与甘草酸含量均符合药典规定。

对照品甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草酸、甘草次酸(上海市食品药品检验所,批号 551-15-5、5041-81-6、578-86-9、961-29-5、1405-86-3、1411-54-2,质量分数 $>98\%$);内标氯唑沙宗、克拉霉素(东京化工有限公司,质量分数 $>99\%$);色谱级乙腈、甲醇(Tedia,美国);甲酸(Merck,美国);分析级醋酸乙酯和甲醛(天津博迪化工股份有限公司);水为超纯水。碘 [^{125}I] 醛固酮放射免疫分析试剂盒、碘 [^{125}I] 皮质醇放射免疫分析试剂盒(北方生物技术研究所以);8%预制胶(南京金斯瑞有限公司);HSD11B2 抗体(Sigma,美国);内参抗体 GAPDH (CST,美国);二抗羊抗兔(MilliPore,美国)。

1.3 仪器

C8000 Roche 自动分析仪(Hoffmann-La Roche,瑞士);光学显微镜(蔡司光学仪器国际贸易有限公司);ACQUITYTMUPLC 超高效液相色谱系统;XevoTMTQ 质谱系统和 Masslynx 4.1 质谱工作站软件(Waters,美国);BACKMAN 冷冻高速离心机、LABCONCO CentriVaP 离心浓缩仪、AL104 电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];混匀小精灵(杭州奥盛仪器有限公司),Synergy 纯水仪(MilliPore,美国),蛋白质电泳仪、蛋白质转膜仪(Bio-Rad,美国)。

2 方法

2.1 受试药物的制备

取甘草饮片适量,10 倍量水浸泡 0.5 h 后煮沸,煎煮 2 次,每次 1 h,合并煎液并浓缩得浸膏,浸膏得率为 48.26%。海藻按相同方法制备,海藻浸膏得率为 53.3%。甘草和海藻药材 1:1 混合,按上述方法制备,甘草-海藻浸膏得率为 43.73%。经 RP-HPLC 法测得甘草单煎提取物中的甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素和甘草酸的质量分数分别为 0.64%、0.27%、0.04%、0.03%、5.37%;海藻-甘草合煎提取物中甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素和甘

草酸的质量分数分别为 0.56%、0.26%、0.04%、0.03%、5.93%。

2.2 大鼠亚急性毒性实验

雄性 SD 大鼠 32 只,按体质量随机分为对照组、海藻组、甘草组、海藻-甘草配伍组,每组 8 只。海藻组、甘草组、海藻-甘草配伍组分别 ig 给药 4 周,每日 2 次,给药剂量分别为 5.33、4.83、8.75 g/kg (按“2.1”项下制备的浸膏量计算),对照组 ig 等量生理盐水。末次给药后大鼠禁食 12 h,麻醉后腹主动脉取血,处死动物,解剖取肾组织,称质量后进行组织病理学检查,再将肾组织分为 4 份,待用。

2.2.1 血清生化指标检测 腹主动脉取血后分离血清,按放免法检测试剂盒说明书进行血清醛固酮、皮质醇水平测定;通过全自动生化分析仪检测血清中 Scr、BUN、Na⁺、K⁺、Cl⁻水平。

2.2.2 病理组织学检查 将部分肾组织固定于 4%甲醛溶液,石蜡包埋,切片,HE 染色,200 倍光镜下评估大鼠肾组织的病理学变化。通过计算肾小球、肾间质和肾小管损伤的程度和频率进行半定量评分,肾损伤评价指标包括肾小球[肾小球病变数、细胞增生(系膜、内皮细胞)、新月体、纤维性硬化与核破裂、透明微血栓和纤维性血栓、系膜基质增生或溶解、肾小球基底膜增厚或变薄、肾小球基底膜破裂]、间质(炎症细胞增多、纤维化)、肾小管(扩张或萎缩、急性小管损伤、小管基底膜异常、肾小管上皮细胞坏死、管腔内有无管型)。将各组肾脏组织进行评分,根据病变程度(损伤/正常)评分:无明显病变 0 分,病变小于 25%为 1 分,病变小于 50%为 2 分,病变小于 75%为 3 分,病变大于 75%为 4 分;每个项目的总分为损伤程度×频率^[12-13]。

2.2.3 肾组织中 6 种成分的定量测定

(1) 对照品及内标溶液制备 分别精密称取甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草酸、甘草次酸对照品适量于量瓶中,加甲醇定容至刻度,即得 100 μg/mL 甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素,80 μg/mL 甘草酸和 250 μg/mL 甘草次酸的混合对照品储备液。精密量取上述混合对照品储备液,用甲醇逐级稀释成一系列质量浓度的混合对照品溶液。精密称取氯唑沙宗、克拉霉素适量于量瓶中,加甲醇定容至刻度,即得 1.01 μg/mL 氯唑沙宗和 200 μg/mL 克拉霉素的混合内标溶液。上述溶液于 4℃ 储藏备用。

(2) 供试品溶液的制备 取 100 μL 含药肾组织匀浆液于 2 mL 离心管中,加混合内标溶液 10 μL,

涡旋 10 s,加 1 mL 醋酸乙酯,涡旋 2 min,10 000×g 离心 5 min,吸取上清液(A),剩余部分加 600 μL 甲醇,14 000×g 离心 10 min,吸取上清液(B),合并 A 与 B,于离心浓缩仪上挥干。残渣用 120 μL 甲醇溶解,涡旋 1 min,14 000×g 离心 10 min,离心后取上清液用于 UPLC-TQ/MS 分析。

(3) 标准曲线对照样品与质控样品的制备 取 90 μL 空白肾组织匀浆液,加入 10 μL 对照品溶液,配制成一系列质量浓度的标准曲线对照样品;取 90 μL 空白肾组织匀浆液,加入 10 μL 对照品溶液,配成低、中、高 3 种质量浓度(其中甘草苷、异甘草苷、甘草素和异甘草素均为 15.6、125、250 ng/mL;甘草酸为 12.5、250、400 ng/mL;甘草次酸为 1.8、312、625 ng/mL)的质控(QC)样品。

(4) 色谱条件 Therom Synchronis C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相为 0.1%甲酸水(A)-乙腈(B);梯度洗脱:0~1 min, 70%→50% A;1~4 min, 50%→5% A;4~5 min, 5% A;5~5.2 min, 5%→70% A;柱温 35℃;体积流量 0.4 mL/min;进样量 5 μL。

(5) 质谱条件 离子源 ESI 源;离子化方式:正离子模式(甘草酸、甘草次酸、克拉霉素),负离子模式(甘草素、异甘草素、甘草苷、异甘草苷、氯唑沙宗);毛细管电压 3 kV;离子源温度 150℃;脱溶剂气温度 400℃;扫描方式多反应监测(MRM)。甘草素 [M-H]⁻ m/z 255.1/119.1;异甘草素 [M-H]⁻ m/z 255.1/119.1;甘草苷 [M-H]⁻ m/z 417.0/255.1;异甘草苷 [M-H]⁻ m/z 417.0/255.1;氯唑沙宗 [M-H]⁻ m/z 168.0/132.0;甘草酸 [M+H]⁺ m/z 823.632/453.442;甘草次酸 [M+H]⁺ m/z 471.185/149.109,克拉霉素 [M+H]⁺ m/z 748.279/158.359。

(6) 方法学考察 按生物样品分析法^[14]对所建立的方法进行线性、特异性、精密性、准确度、回收率、基质效应和稳定性的考察。

2.2.4 Western blotting 法检测 HSD11B2 的表达 取一定量肾组织,加液氮研磨成粉,每 100 毫克组织加 1 mL 裂解液,充分裂解后离心取上清,BCA 法测定组织蛋白浓度,使上样质量浓度在 80~100 μg/μL,样品与蛋白上样缓冲液按 4:1 混合,煮沸 10 min;8% SDS-PAGE 胶 90 V 恒压电泳, PVDF 膜恒流 300 mA 湿转 60 min,5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,一抗 HSD11B2 按 1:500 稀释, GAPDH 为内参,按 1:2 000 稀释,4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜

5 次, 依次为 5、5、8、8、10 min, 二抗按 1:10 000 稀释, 孵育 1 h, TBST 洗膜 5 次, ECL 工作液滴加至印迹膜室温孵育 2 min, 采用 CCD 扫描成像系统分析。结果以蛋白条带的灰度值/内参条带的灰度值表示。

2.3 统计学处理

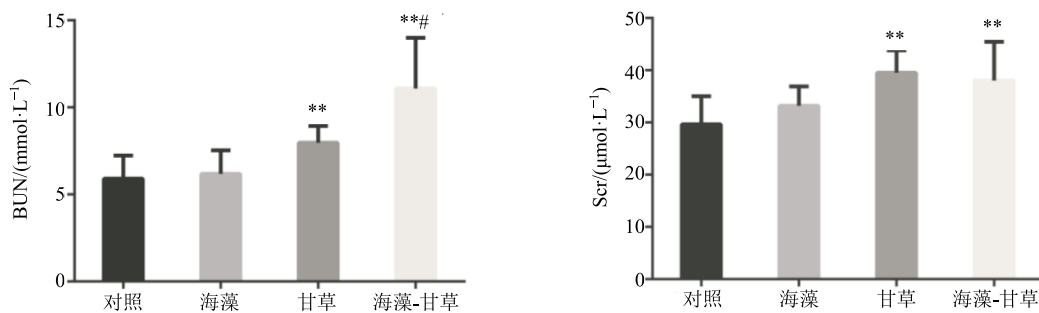
实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 通过 SPSS 15.0 进行分析, 多组间比较采用方差分析, 实验组间两两比较采用 t 检验, 以及 Mann-Whitney 检验分析组织病理学评分。

3 结果

3.1 血清生化指标

大鼠给药 4 周后, 海藻组的各项生化指标与对照

组相比均无明显变化; 甘草组与海藻-甘草组大鼠血清中 BUN、Scr 水平均明显高于对照组 ($P < 0.01$); 而且海藻-甘草组的 BUN 明显高于甘草组 ($P < 0.05$), 结果见图 1。与对照组相比, 甘草组、海藻-甘草组大鼠血清醛固酮水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与甘草组相比, 海藻-甘草组大鼠血清醛固酮水平明显降低 ($P < 0.05$); 与对照组相比, 海藻组大鼠血清皮质醇水平略有降低, 但无统计学意义; 甘草组、海藻-甘草组大鼠血清皮质醇水平呈上升趋势, 其中海藻-甘草组明显高于对照组 ($P < 0.05$), 结果见图 2。与对照组比较, 海藻-甘草组大鼠血清中的 K^+ 、 Cl^- 浓度明显下降 ($P < 0.05$ 、 0.01), 结果见图 3。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与甘草组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs *G. uralensis* group, same as below

图 1 各组大鼠血清中 BUN、Scr 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Levels of BUN and Scr in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

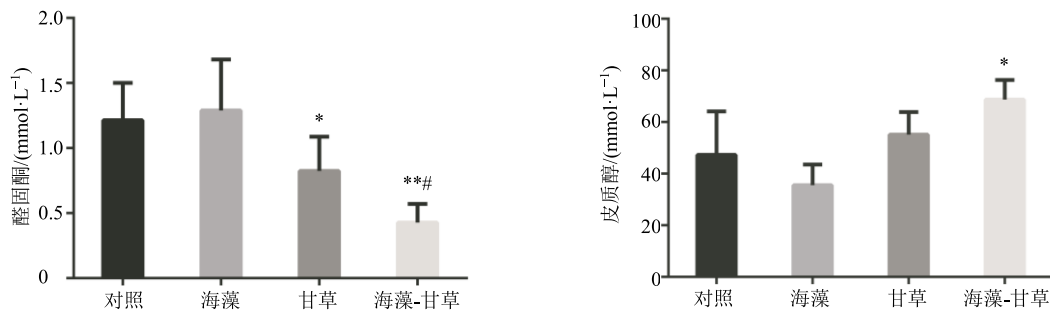


图 2 各组大鼠血清中醛固酮和皮质醇水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Levels of aldosterone and cortisol in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

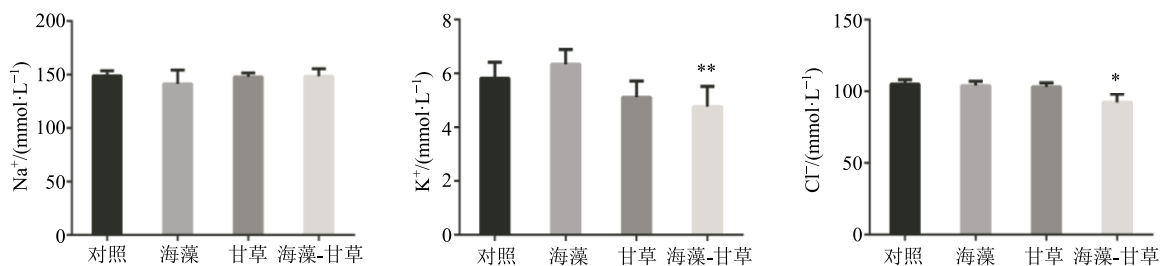


图 3 各组大鼠血清中 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Levels of Na^+ , K^+ , and Cl^- in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.2 病理学分析

如图 4 显示, 给药 4 周后, 对照组和海藻组肾组织结构清晰, 无明显病变。甘草组大鼠的肾小管周围出现轻、中度炎性细胞浸润和轻度蛋白管型。海藻-甘草组大鼠的肾小管周围有炎性细胞浸润, 壁层上皮细胞增生, 以及蛋白管型。肾脏病变集中在肾小管和肾间质。根据病理损伤的半定量分析, 与对照组相比, 海藻组无明显变化, 甘草组与海藻-甘草组的肾小管与肾间质损伤明显增加 ($P < 0.01$); 其中海藻-甘草组的肾小管与肾间质损伤明显高于甘草组 ($P < 0.01$), 见表 1。

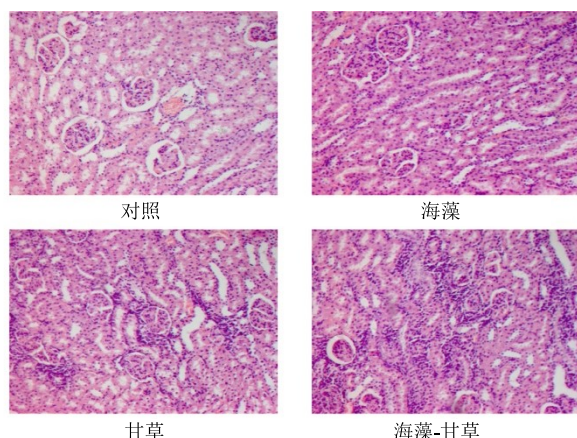


图 4 各组大鼠的肾组织病理观察 (HE, ×200)

Fig. 4 Renal histopathology of rat in each group (HE, ×200)

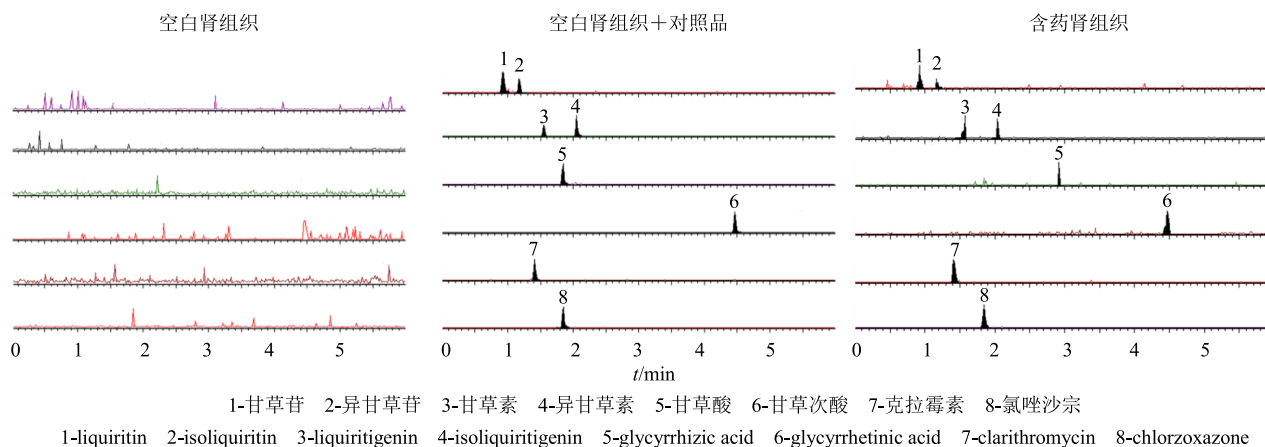


图 5 肾组织匀浆液样品色谱图

Fig. 5 Chromatograms of kidney homogenate sample

与准确度, 结果 6 种活性成分的日内精密度的 9.32%~13.86%, 日间精密度在 10.56%~15.71%, 准确度在 75.64%~112.97%; 表明该法精密度与准确度良好。

3.3.4 提取回收率与基质效应 取高、中、低 3 种质量浓度 QC 样品各 6 份, 按“2.2.3”项下方法制

表 1 各组大鼠肾脏病理损伤半定量分析 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Semi-quantitative analysis of renal pathological injury in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	肾间质	肾小管
对照	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
海藻	0.25 ± 0.71	0.50 ± 1.41
甘草	3.13 ± 2.59**	2.38 ± 2.00**
海藻-甘草	7.13 ± 1.89***	6.75 ± 2.05***

3.3 肾组织中 6 种成分分析

3.3.1 专属性试验 取大鼠空白肾组织匀浆液, 空白肾组织匀浆液加入混合对照品, 含药肾组织匀浆液各 100 μ L, 按“2.2.3”项下方法处理, 分别进样, 记录色谱图。结果表明肾组织匀浆液中内源性物质与其他待检测物成分均无干扰。见图 5。

3.3.2 线性关系、最低定量限和检测限 按“2.2.3”项下方法对含甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草酸、甘草次酸系列质量浓度的血浆样品进行处理, 以待测物质量浓度为横坐标 (X), 待测物峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标 (Y), 采用加权最小二乘法进行线性回归, 得到线性方程, 见表 2。

3.3.3 精密度与准确度 取高、中、低 3 种质量浓度 QC 样品各 6 份, 按“2.2.3”项下方法制备测定液, 经 UPLC-TQ/MS 分析, 计算日内、日间精密度

备测定液, 经 UPLC-TQ/MS 分析, 测定其绝对回收率和基质效应。结果 6 种成分回收率在 72.99%~121.54%, 内标回收率在 82.34%~105.38%; 6 种成分基质效应在 83.28%~121.32%, 内标基质效应在 79.29%~105.63%。

3.3.5 稳定性 取高、中、低 3 种质量浓度 QC 样

表 2 甘草中 6 种活性成分的回归方程及定量限 (LOQ)、检测限 (LOD)
Table 2 Calibration curves, LOD, and LOQ of six active compounds in *G. uralensis*

成分	回归方程	R^2	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	LOD/(ng·mL ⁻¹)	LOQ/(ng·mL ⁻¹)
甘草苷	$Y=0.002 X-0.014$	0.994	15.6~250	2.14	7.14
异甘草苷	$Y=0.001 X+0.036$	0.995	15.6~250	1.54	5.14
甘草素	$Y=0.004 X-0.057$	0.997	15.6~250	1.36	7.86
异甘草素	$Y=0.009 X-0.012$	0.997	15.6~250	4.04	13.48
甘草酸	$Y=0.011 X+0.113$	0.992	12.5~400	2.23	7.43
甘草次酸	$Y=0.126 X+0.145$	0.996	18.0~625	1.29	4.30

品各 6 份, 分别在室温下放置 24 h, -80 ℃ 下保存 1 个月, -80 ℃ 反复冻融 3 次, 按“2.2.3”项下方法制备测定液, 经 UPLC-TQ/MS 分析。结果 6 种成分峰面积 RSD 均为 7.53%~14.5%, 表明样品在该条件下稳定性良好。

3.3.6 样品测定结果 取肾组织, 按“2.2.3”项下方法制备测定液, 经 UPLC-TQ/MS 分析, 结果表明, 海藻-甘草组肾组织中的甘草次酸蓄积水平明显高于甘草组 ($P<0.01$), 见表 3。

3.4 HSD11B2 表达分析

与对照组相比, 海藻组大鼠肾组织中 HSD11B2

水平无明显变化, 甘草组、海藻-甘草组大鼠肾组织中 HSD11B2 表达水平明显降低 ($P<0.05$ 、0.01)。与甘草组相比, 海藻-甘草组 HSD11B2 水平明显下降 ($P<0.05$), 见图 6。

4 讨论

甘草和海藻都广泛应用于药品、保健品和食品, 其中甘草被称为“国老”, 用来调和诸药, 有“十方九草”之说。甘草的主要活性成分包括甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素和甘草酸, 而甘草次酸作为甘草酸的活性代谢产物, 也是评价甘草安全性的重要指标^[15]。由于海藻的主要成分为多糖和无

表 3 大鼠肾组织中 6 种成分的含量 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Table 3 Concentration of six components in kidney of rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	甘草苷/(ng·mL ⁻¹)	异甘草苷/(ng·mL ⁻¹)	甘草素/(ng·mL ⁻¹)	异甘草素/(ng·mL ⁻¹)	甘草酸/(ng·mL ⁻¹)	甘草次酸/(ng·mL ⁻¹)
甘草	20.32±6.34	11.61±2.40	40.24±19.64	3.32±1.71	13.24±6.14	27.99±10.46
海藻-甘草	23.02±8.46	16.74±7.82	32.57±14.06	5.05±1.92	42.39±22.36	81.16±24.89 ^{##}

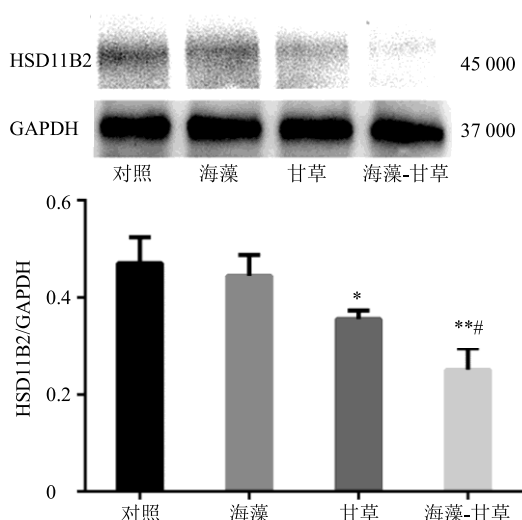


图 6 各组大鼠肾组织 HSD11B2 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 6 Expression of HSD11B2 in renal tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

机盐, 其在生物样本中难以定量, 因此本实验通过考察甘草 6 种主要活性成分的变化, 来衡量海藻对甘草的影响。本实验在生物样本处理过程中, 通过结合醋酸乙酯萃取和甲醇沉蛋白 2 种方法, 同时测得肾组织中的甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草酸和甘草次酸的量。前期分别考察了醋酸乙酯和甲醇 2 种方法, 发现醋酸乙酯法中的甘草酸, 甲醇沉蛋白法中的异甘草苷和异甘草素的提取回收率小于 50%。两法同用时, 所测 6 种活性成分的提取回收率均大于 70%, 符合生物样品的定量要求。

通过现有文献调查, 发现过量使用甘草可能导致水钠潴留、低血钾症和肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS) 紊乱等不良反应^[16]。甘草次酸作为甘草中的主要代谢产物, 临床上的不良反应多为假性醛固酮增多症, 表现为高血压、低钾血症、代谢性碱中毒、血及尿中皮质醇含量升高但醛固酮含量降低^[17-19]。大量的文献报道表明 HSD11B2 是糖皮

质激素代谢的关键酶, 可将糖皮质激素皮质醇氧化成无活性的代谢物可的松 (啮齿动物称皮质酮), 从而防止盐皮质激素受体的非法活化^[20]。高浓度的甘草次酸通过抑制肾脏中 HSD11B2 活性, 使皮质醇向皮质酮转化减少, 竞争性拮抗醛固酮, 造成 RAAS 紊乱^[21]。有研究表明, 与单用甘草相比, 昆布-甘草提取物增加了甘草次酸的血浆暴露^[22-23], 一般认为药物功效、药材基原以及化学成分相同的中药, 其物质基础具有一定共性, 可能存在着一些共同规律^[24], 而海藻与昆布同属褐藻门, 两者化学成分与药效相似^[25-26], 因此昆布-甘草的药动学变化与海藻-甘草的肾组织药物蓄积可能存在某种共同规律。

本研究中, 与对照组相比, 海藻组无明显变化, 口服海藻-甘草提取物导致大鼠血清中醛固酮、K⁺和 Na⁺明显降低, 而 BUN、Scr、皮质醇水平显著上升。BUN、Scr 是评价肾功能的重要指标, 当二者数值升高则表明肾小球的滤过功能下降^[27]。组织病理学检查显示海藻-甘草提取物引起肾脏组织发生明显的病理性改变, 结合血清中 BUN、Scr 的变化, 提示肾是其毒性靶器官之一。口服甘草同样导致大鼠血清中 BUN、Scr、醛固酮浓度明显降低, 肾组织轻微病变, 但海藻-甘草组 BUN 指标与肾组织病变程度明显高于甘草组, 推测可能是海藻加剧了甘草的毒性作用。通过 UPLC-TQ/MS 考察甘草 6 种活性成分在肾组织中浓度变化, 发现海藻明显增加甘草次酸在肾组织中的蓄积, 这可能是海藻与甘草“反”的物质基础之一。综上所述, 海藻-甘草导致肾毒性的机制之一可能是由于海藻提高了甘草次酸在肾组织中的蓄积水平, 而过量的甘草次酸通过抑制肾组织 HSD11B2 活性, 导致皮质酮、醛固酮等固醇激素水平以及电解质紊乱, 最终诱发肾毒性。

海藻-甘草反药组合的毒性机制极其复杂, 二者配伍作用于机体多个脏器, 本课题组还对海藻-甘草配伍所致心脏毒性和肝脏毒性进行了研究, 发现心脏和肝脏的相关指标均发生了不同程度的变化, 但对导致其变化的内在机制目前尚不明确, 还有待进一步探讨。本研究从肾毒性的角度出发, 初步探索了海藻-甘草反药组合的致毒机制, 对海藻反甘草进行了科学的解释, 为海藻-甘草配伍的临床用药提供实验依据, 同时也为后续深入研究海藻反甘草的毒性机制提供参考。而对于海藻相关成分以及甘草中其他活性成分在海藻-甘草反药组合中所起到的作用, 目前尚无定论, 仍需进一步深入研究。

参考文献

- [1] 刘佳, 费宇彤, 钟赣生, 等. 十八反中甘草海藻反药组合临床同用文献的文献特征分析 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(5): 1449-1453.
- [2] 潘艳琼. 海藻、甘草同方应用探讨 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(17): 87-88.
- [3] 刘云翔, 钟赣生, 李怡文, 等. 海藻与甘草反药组合的研究述评 [A] // 第五届全国临床中药学学术研讨会论文集 [C]. 北京: 中华中医药学会, 2012.
- [4] 刘观湘. 海藻甘草配伍致心肾损害 1 例 [J]. 陕西中医, 1996, 17(11): 521.
- [5] 贾先红. 海藻与甘草同用临床不良反应的报道 [J]. 新中医, 2012, 44(5): 177-178.
- [6] 修琳琳, 王思睿, 钟赣生, 等. 海蒿子、羊栖菜、生甘草配伍及海藻玉壶汤中海藻不同品种与生甘草加减配伍的急性毒性实验研究 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5): 1933-1936.
- [7] 曹琰. 基于“十八反”的中药配伍禁忌理论基础研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [8] 李怡文, 钟赣生, 柳海艳, 等. 基于均匀设计的海藻玉壶汤中海藻与甘草不同比例配伍对甲状腺肿大鼠模型肝脏功能及病理形态的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(5): 1295-1300.
- [9] 丁选胜, 李欧. 海藻甘草及其相配伍后的水提取物的肝毒性研究—对离体大鼠肝灌流液中黄嘌呤氧化酶的影响 [J]. 江苏中医药, 2002, 23(10): 51-54.
- [10] 叶敏, 赵一鸣. 海藻甘草配伍对小鼠急性肝损伤的影响 [J]. 现代中药研究与实践, 2006, 20(5): 30-32.
- [11] Zhang Y B, Wei X, Yang X W, et al. Simultaneous determination of nine constituents in the roots and rhizomes of *Glycyrrhiza uralensis* from different producing areas by RP-HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2013(2): 214-219.
- [12] Li Z D, Zhang X L, Yi N, et al. Elimination of etimicin in rat kidneys and alterations of its cytotoxicity to tubular epithelial cells [J]. *Human Exper Toxicol*, 2015, 34(5): 479-486.
- [13] van Kleef E M, Zurcher C, Oussoren Y G, et al. Long-term effects of total-body irradiation on the kidney of Rhesus monkeys [J]. *Int J Rad Biol*, 2000, 76(5): 641.
- [14] FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, Center for Drug Evaluation and Research [S]. 2001.
- [15] 孙明谦. 甘草中化学成分的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2006.
- [16] 毛敏, 李伟, 王巍, 等. 甘草制剂导致不良反应 93 例病例分析 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(21): 3768-3772.

- [17] Shibata S. A drug over the millennia: pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of licorice [J]. *Yakugaku Zasshi J Pharm Soc Japan*, 2001, 32(6): 849-862.
- [18] Takeda S, Ishihara K, Wakui Y, *et al.* Bioavailability study of glycyrrhetic acid after oral administration of glycyrrhizin in rats; relevance to the intestinal bacterial hydrolysis [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1996, 48(9): 902-905.
- [19] Cantelli-Forti G, Maffei F, Hrelia P, *et al.* Interaction of licorice on glycyrrhizin pharmacokinetics [J]. *Environ Health Perspect*, 1994, 102(Suppl 9): 65-68.
- [20] Frey B M. Glucocorticoid-mediated mineralocorticoid receptor activation and hypertension [J]. *Curr Opin Nephrol Hypert*, 2004, 13(4): 451-458.
- [21] Rossum T G V, Jong F H D, Hop W C, *et al.* 'Pseudo-aldosteronism' induced by intravenous glycyrrhizin treatment of chronic hepatitis C patients [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2001, 16(7): 789.
- [22] Zhao W M, Jiang S W, Chen Y, *et al.* *Laminaria japonica* increases plasma exposure of glycyrrhetic acid following oral administration of *Liquorice* extract in rats [J]. *Chin J Nat Med*, 2015, 13(7): 540-549.
- [23] 杨婷婷, 王舒婷, 刘佩华, 等. 甘草与昆布配伍对大鼠肝肾功能及血清指标的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(8): 1860-1865.
- [24] 段金殿. 基于十八反的中药配伍禁忌毒一效关联研究 [A] // 中国毒理学会第七次全国毒理学大会暨第八届湖北科技论坛论文集 [C]. 武汉: 中国毒理学会、湖北省科学技术协会, 2015.
- [25] Zeng C K, Tseng C K, Zhang J F, *et al.* Chinese seaweeds in herbal medicine [J]. *Hydrobiologia*, 1984, 116/117(1): 152-154.
- [26] Peng Z, Liu M, Fang Z, *et al.* Composition and cytotoxicity of a novel polysaccharide from brown alga a novel polysaccharide from brown alga (*Laminaria japonica*) [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 89(4): 1022-1026.
- [27] Braunwald E. *Harrison's Principles of Internal Medicine* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003.