

基于细胞的中药成分肾毒性研究*

□王 旗** 刘 庆 沈晓帆 江 芳

(北京大学公共卫生学院毒理学系 北京 100191)

摘 要:为探讨基于细胞的中药安全性评价新方法的有效性,本文对常用的肾小管上皮细胞的特点及其在中药成分体外肾毒性研究中的应用情况进行概述,并对基于细胞的中药肾毒性评价方法的应用前景进行展望。

关键词:中药成分 肾毒性 细胞 安全性评价

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2010.04.022

近年来,中药所致肾脏损害日益受到人们的重视。肾脏是体内药物的主要代谢和排泄器官,也是药物毒副作用的主要靶器官。目前已报道有肾毒性的中药达 60 多种^[1],中药肾毒性已经成为制约中药现代化和临床应用的一大障碍。为了确保中药的安全使用,有必要加强中药成分的毒理学研究,建立具有中医药特色的毒理评价体系,以指导临床更合理的使用中药,使中药更好的走向世界。

研究药物肾毒性的传统方法多采用体内动物实验,但动物实验所需样品量大,而提取、分离并纯化大量中药成分比较困难。随着国际上实验动物使用的“3R”即减少(Reduction)、替代(Replacement)、优化(Refinement)原则的倡导与实施,用替代方法对药物的早期毒性进行高通量筛选已开展大量研究,用培养细胞进行体外毒性分析已发展为早期毒性评价的重要替代方法^[2-3]。

为探讨基于细胞的中药肾毒性评价方法的有效性,本文对常用的肾小管上皮细胞的特点及其在中

药成分体外肾毒性研究中的应用情况进行概述,并对基于细胞的中药肾毒性评价方法的应用前景进行展望。

一、常用肾小管细胞系及毒性评价

由于肾近端小管拥有庞大的转运系统和丰富的生物转化酶,对外源性毒物的损害特别敏感,是药物肾毒性损伤最常见的部位,肾近端小管细胞系已成为研究药物肾毒性可靠的细胞模型,广泛应用于药物肾毒性的评价及机制研究中^[4-6]。

目前,常用的肾近端小管细胞系有:猪肾小管上皮细胞 LLC-PK1 (Pig kidney proximal tubular epithelial cell)、犬肾小管上皮细胞 MDCK (Madin-Darby canine kidney) 和人肾小管上皮细胞 HK-2 (Human kidney-2) 等^[6]。

LLC-PK1 细胞系源自猪的肾小管上皮细胞,具有钠依赖性的磷酸盐、氨基酸和葡萄糖转运系统及乳酸盐转运系统,高表达谷胱甘肽 S-转移酶(Glutathione S-transferase, GST)、还原型辅酶 II (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphat, NADPH) 和细胞

收稿日期: 2009-12-09

修回日期: 2010-01-05

* 北京市科委科技计划项目(Z0004105040311): 先导物和中药的 ADMET 性质快速集成评价实验平台, 负责人: 杨秀伟。

** 联系人: 王旗, 副教授, 硕士生导师, 主要研究方向: 中药安全性研究, Tel: 010-82801527, E-mail: wangqi@bjmu.edu.cn。

色素 C 还原酶,但无法进行糖原异生,对甲状旁腺激素不敏感,缺乏对丙磺舒敏感的有机阴离子转运系统,作为肾毒性研究的细胞模型之一,已用于马兜铃酸类似物的结构与毒性关系和毒性机制研究^[7-9]。

MDCK 细胞系是一种小犬肾小管细胞,其特点是细胞汇合后表达分化的上皮细胞特性,拥有典型的选择性阳离子上皮细胞旁通道和大量能反映早期肾损伤的肾小管刷状缘酶。国外已有不少报道用 MDCK 细胞进行药物肾毒性研究,如研究顺铂化合物、NPC-14686、环磷酰胺及其异构体异环磷酰胺的肾毒性^[10-12]。近年来用 MDCK 细胞研究氯化汞(Hg-Cl_2)的肾毒性及其机制,结果表明,MDCK 细胞对典型的肾毒物 HgCl_2 特别敏感^[13-16]。刘庆等^[17]用 MDCK 细胞建立了筛选中药成分肾毒性的试验系统。

HK-2 细胞系由 Ryan 等^[18]于 1994 年建立,源于正常成年男性肾近端小管上皮细胞,经人乳头状瘤病毒(HPV 16)的 E6/E7 基因转染而永生。HK-2 细胞保持了肾小管上皮细胞特有的钠依赖性的葡萄糖转运系统,对甲状旁腺激素的调节作用也非常敏感,HK-2 细胞能够利用和储存糖原,进行糖原异生。HK-2 细胞是成人肾细胞,且功能更加接近原代培养的肾小管上皮细胞,已经成为研究药物肾毒性及肾小管损伤机制的重要细胞模型^[5-6]。

药物对肾小管上皮细胞毒性的评价可以从细胞形态学、细胞生长和增殖活性、细胞结构损伤、细胞凋亡与细胞周期、细胞代谢功能和细胞的转运功能等多个方面进行^[12-17,19]。

二、在中药成分体外肾毒性研究中的应用

中药多为复方用药,一种中药含有多种化学成分,因而中药肾毒性的现代研究难度大,工作量也很大。用肾小管上皮细胞对中药成分进行体外肾毒性高通量快速筛选,及时发现毒性大的化合物,并深入研究其肾毒性机制,还可研究中药成分联合用药的肾毒性,探讨配伍减毒、防治中药肾毒性的有效途径。肾小管上皮细胞现已应用于一些中药成分的体外肾毒性筛选及其毒性作用机制的研究。

1. 基于 MDCK 细胞的中药成分体外肾毒性筛选

刘庆等^[17]以 HgCl_2 作为阳性对照,用 MDCK 细胞比较研究了已知有肾毒性的马兜铃酸 I (Aristolochic acid I, AA I) 和马兜铃酸 II (AA II) 及未发现有肾毒性的苦参碱(Matrine)、氧化苦参碱(Oxymatrine)和

肉豆蔻醚(Myristicin)5 种中药成分的体外肾毒性,以探讨基于 MDCK 细胞评价中药成分肾毒性替代动物实验方法的可能性。研究结果显示,AA I 和 AA II 对 MDCK 细胞存活具有明显的抑制作用,并呈剂量和时间依赖性;细胞形态学的改变亦表明 AA I 和 AA II 具有细胞毒作用。LDH 释放实验结果表明,AA I 和 AA II 均可损伤 MDCK 细胞膜。此结果与以往体内实验研究结果基本一致^[20-22]。高浓度($10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)苦参碱、氧化苦参碱和肉豆蔻醚对 MDCK 细胞存活无明显影响,对 MDCK 细胞膜未见损伤作用。这与以往未见苦参碱、氧化苦参碱和肉豆蔻醚肾毒性研究的报道是一致的。

AAI、AAII、苦参碱、氧化苦参碱和肉豆蔻醚对 MDCK 细胞的损伤作用差异,验证了可用 MDCK 细胞培养体系进行中药成分体外肾毒性评价。

2. 在马兜铃酸肾毒性研究中的应用

含马兜铃酸类中药是比较有代表性的肾毒性中药,引起的急性肾损伤的病变部位主要在肾小管,而肾小球病变不明显^[23]。很多研究从细胞水平来探讨马兜铃酸(Aristolochic acid, AA)的毒性机制。研究表明,AAI 和 AAI 是 AA 的主要成分,也是其主要的毒性成分^[24],AAI 和 AAI 可引起 HK-2、LLC-PK1 细胞凋亡^[8,21],AA 具有“胞浆毒”特性,可直接对肾小管上皮细胞产生坏死作用^[22]。AA 具有很强的肾毒性,其代谢产物马兜铃内酰胺(Aristololactam, AL)也有肾毒性^[25]。AA 诱导肾小管上皮细胞钙通道开放,大量细胞外钙内流,使细胞内游离钙离子浓度显著升高^[26];并通过激活细胞半胱天冬酶 3(Caspase 3)的活性^[12],使肾小管上皮细胞发生凋亡。

Balachandran 等^[17]用 LLC-PK1 细胞系统地研究了马兜铃酸的化学结构与毒性的关系,发现环状结构、取代基组成及位置都与毒性关系很大。8 位甲氧基和 10 位硝基是决定毒性的关键因素,AAI 毒性最强。刘庆等^[27]通过比较研究 AAI、AAII 和去硝基 AAI (dN-AAII)的肾细胞毒性,考察结构改变对其毒性的影响,探讨硝基在马兜铃酸肾毒性中的作用。研究结果表明,AAII 去硝基后对 MDCK 细胞存活抑制作用大幅减弱,但仍存在一定的抑制作用;AAII 去硝基后所致的细胞损伤仍与细胞凋亡有关。AAI、AAII 和 dN-AAII 对 MDCK 细胞的凋亡或坏死作用均与活性氧生成有关。AAI、AAII 对细胞存活抑制作用比其代谢产物强,而去掉硝基后其代谢产物不抑制 MDCK

细胞存活,提示硝基可能是决定 AA 毒性的关键因素之一,也可能对 AA 代谢产物的毒性起重要作用。

3. 在七叶皂苷肾毒性研究中的应用

七叶皂苷是中药娑罗子提取物中的总皂苷,属三萜皂苷类化合物,其主要活性成分为七叶皂苷 Ia(A)、七叶皂苷 Ib(B)、异七叶皂苷 Ia(C)、异七叶皂苷 Ib(D)。七叶皂苷 A、B 称为 β -七叶皂苷, C、D 称为 α -七叶皂苷,其中 β -七叶皂苷是主要的活性异构体。七叶皂苷具有消炎、抗渗出、恢复毛细血管通透性、提高静脉张力、改善血液循环、促进脑功能恢复等作用,而不具有激素样副作用,且其来源丰富,临床上广泛应用于治疗各种水肿、哮喘和慢性静脉功能不全等疾病。近年时有应用七叶皂苷导致肾功能衰竭的临床报道,七叶皂苷的肾毒性引起关注。

沈晓帆等^[28]用 HK-2 细胞研究不同组分的七叶皂苷 AB、CD、ABCD 和七叶皂苷钠注射剂提取物(YTLY)的体外肾毒性,并探讨两种抗氧化剂维生素 C(Vit C)和还原型谷胱甘肽(GSH)对其肾损伤有无保护作用。

研究表明,七叶皂苷对 HK-2 细胞具有明显的毒性,七叶皂苷不同组分之间的肾细胞毒性存在显著差异,MTT 法测得的半数抑制浓度(IC₅₀)值分别为:七叶皂苷 AB $26.53 \pm 1.67 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, CD $35.45 \pm 2.16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, ABCD $28.44 \pm 1.78 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, YTLY $23.34 \pm 1.67 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在一定浓度范围内,GSH 对七叶皂苷 YTLY 导致的细胞毒性具有一定的保护作用,有望作为防治七叶皂苷肾毒性的一个有效对策。

4. 在补骨脂酚及其与补骨脂素联合的肾毒性研究中的应用

中药补骨脂为豆科植物补骨脂 (*Psoralea corylifolia* L.) 的干燥成熟果实,具有温肾助阳、纳气、止泻之功效。补骨脂含有多种活性成分,主要为补骨脂素和异补骨脂素,2005 年版《中华人民共和国药典》规定其总含量不得少于 0.7%。近年来,国内外学者对补骨脂化学成分的提取分离及相关药理作用进行了多方面的研究,其另一主要成分补骨脂酚引起学者们的关注。补骨脂中补骨脂酚含量约 1%~7%,为单萜酚类化合物。补骨脂酚具有保护肝细胞、抗炎退热、抗氧化、抑制单胺转运体、抑癌、弱雌激素样作用、免疫抑制等多种活性作用。国内学者曾于 1981 年用昆明种小鼠观察到补骨脂酚的体内肾毒性。鉴于中药补骨脂的广泛应用,且其主要成分之一补骨脂酚的

含量远高于补骨脂素和异补骨脂素含量的总和,有必要深入系统地研究补骨脂酚的肾毒性作用。

江芳等^[29]用 HK-2 细胞研究补骨脂酚及其与补骨脂素联合的体外肾毒性,并对其毒性作用机制进行初探。实验结果显示,补骨脂酚对 HK-2 细胞有明显的毒性,补骨脂素 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 单独作用于 HK-2 细胞,没有细胞毒性作用;与补骨脂酚合用时亦没有表现出增强或者减弱补骨脂酚细胞毒性的作用。经大鼠肝匀浆 S9 作用后,补骨脂酚的细胞毒性明显降低。补骨脂酚肾细胞毒性作用机制可能为:直接对细胞膜造成损伤;引发细胞凋亡;抑制细胞内的 DNA 合成,阻滞细胞的有丝分裂,抑制细胞的增殖。

三、细胞水平的中药成分肾毒性研究方法 应用前景展望

中药是通过“尝百草”的自身实践来评价毒性,没有经过系统的安全性评价。中国古人对药物的毒性早有认识,《神农本草经》对毒性就有记载,根据毒性的强弱,把中药分为“上、中、下”三品,为中药毒理学的雏形阶段,但中药的安全性现代研究起步晚,研究基础薄弱,迫切需要借鉴现代医学研究的新思路、新方法和新技术,建立既能体现中医药优势和特色,又能与国际接轨的中药安全性评价方法体系。

肾小管细胞已广泛用于药物肾损伤的机制、先导化合物的筛选和系列化合物肾毒性的比较研究,也已成功应用于中药成分的肾毒性研究。对化学成分明确的中药,可用基于肾小管细胞的体外肾毒性研究方法评价中药成分肾毒性,不失为一种高通量筛选肾毒性、阐明中药成分肾毒性作用机制的途径和方法。但体外基于细胞的肾毒性研究也有其局限性:由于实验体系没有器官和组织的相互作用、缺乏完整免疫系统和血液循环,因此,这些方法适用于早期肾毒性筛选和毒性作用机制研究,且体外研究结果还需结合体内实验研究进一步确认。

参考文献

- 1 王迎春, 仲来福. 中草药致肾损害机理的研究进展. 时珍国医国药, 2006, 17 (5):834-835.
- 2 Stevens JL, Baker TK. The future of drug safety testing: expanding the view and narrowing the focus. Drug Discov. Today, 2009, 14:162-167.
- 3 Li W, Choy DF, Lam MS, et al. Use of cultured cells of kidney origin to assess specific cytotoxic effects of nephrotoxins. Toxicol in Vitro, 2003, 17:107-113.

- 4 Li W, Lam M, Choy D, et al. Human primary renal cells as a model for toxicity assessment of chemo-therapeutic drugs. *Toxicol in Vitro*, 2006, 20: 669-676.
- 5 Zhang LJ, Mu XQ, Fu JL, et al. In vitro cytotoxicity assay with selected chemicals using human cells to predict target-organ toxicity of liver and kidney. *Toxicol in Vitro*, 2007, 21:734-740.
- 6 闫长会, 吴纯启, 廖明阳. 肾近端小管细胞系在药物肾毒性评价中的应用. *国外医学药学分册*, 2003, 30(4):234-237.
- 7 Balachandran P, Wei F, Lin RC, et al. Structure activity relationships of aristolochic acid analogues: Toxicity in cultured renal epithelial cells. *Kidney Int*, 2005, 67:1797-1805.
- 8 高瑞通, 郑法雷, 刘彦信等. 马兜铃酸 I 诱导的 LLC-PK1 细胞凋亡及其意义. *中华肾脏病杂志*, 1999, 15(3):162-165.
- 9 Gao RT, Zheng FL, Liu YX, et al. Aristolochic acid I-induced cell apoptosis in LLC-PK1 cells and amelioration of the apoptotic damage by calcium antagonist. *Chin. Med. J*, 2000, 113:418-424.
- 10 Ludwig T, Riethmuller C, Gekle M, et al. Nephrotoxicity of platinum complexes is related to basolateral organic cation transport. *Kidney Int*, 2004, 66:196-202.
- 11 Jan CR, Wang JL, Chou KL, et al. NPC-14686, a novel anti-inflammatory agent increased intracellular Ca^{2+} concentrations in MDCK renal tubular cells. *Inter J Immunopharma*, 2000, 22:915-921.
- 12 Broadhead CL, Walker D, Skinner R, et al. Differential cytotoxicity of Ifosfamide and its metabolites in renal epithelial cell cultures. *Toxicol in Vitro*, 1998, 12:209-217.
- 13 Yeh JH, Chung HM, Ho CM, et al. Mercury-induced Ca^{2+} increase and cytotoxicity in renal tubular cells. *Life Sci*, 2004, 74:2075-2083.
- 14 Aleo MF, Morandini F, Bettoni F, et al. Endogenous thiols and MRP transporters contribute to Hg^{2+} efflux in $HgCl_2$ -treated tubular MDCK cells. *Toxicology*, 2005, 206:137-151.
- 15 Aleo MF, Morandini F, Bettoni F, et al. Antioxidant potential and gap junction-mediated intercellular communication as early biological markers of mercuric chloride toxicity in the MDCK cell line. *Toxicol in Vitro*, 2002, 16:457-465.
- 16 Aleo MF, Morandini F, Bettoni F, et al. In vitro study of the nephro-toxic mechanism of mercuric chloride. *Med Lav*, 2002, 93 (3):267-278.
- 17 刘庆, 王旗, 杨秀伟, 等. 基于 MDCK 细胞的中药成分体外肾毒性研究. *中国药理学与毒理学杂志*, 2007, 21(6):521-528.
- 18 Ryan MJ, Johnson G, Kirk J, et al. HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int*, 1994, 45:48-57.
- 19 Barrientos AA, O'Connor JE, Castillo RN, et al. Use of flow cytometry and confocal microscopy techniques to investigate early $CdCl_2$ -induced nephrotoxicity in vitro. *Toxicol In Vitro*, 2001, 15, 407-412.
- 20 徐晓月, 张陆勇, 江振洲. 马兜铃酸 I 肾毒性的实验研究. *中国生化药物杂志*, 2006, 27(6):336-339.
- 21 郭永超, 林哲绚, 李慧, 等. 三种马兜铃酸类化合物对 HK-2 细胞的毒性比较. *癌变·畸变·突变*, 2006, 18(2):88-92.
- 22 唐功耀, 田雪飞, 湛贻璞. 马兜铃酸对人肾细胞细胞作用的实验研究. *中华肾脏病杂志*, 2002, 18(4):266-269.
- 23 梁爱华, 丁晓霜, 刘保延. 含马兜铃酸中药的肾脏毒性研究概况. *中国中药杂志*, 2004, 28(1):10-14.
- 24 乔洪翔, 李连达, 吴理茂. 马兜铃酸细胞分子毒理学研究进展. *中国药理学与毒理学杂志*, 2006, 20(6):515-520.
- 25 李彪, 李晓玫, 张翠英, 等. 马兜铃酸 I 及马兜铃内酰胺 I 对肾小管上皮细胞损伤的差异. *北京大学学报(医学版)*, 2004, 36(1):36-40.
- 26 Hsin YH, Cheng CH, Tzen JT, et al. Effect of aristolochic acid on intracellular calcium concentration and its links with apoptosis in renal tubular cells. *Apoptosis*, 2006, 11(12):2167-77.
- 27 Liu Q, Wang Q, Yang XW, et al. Differential cytotoxic effects of denitroaristolochic acid II and aristolochic acids on renal epithelial cells. *Toxicol Lett*, 2009, 184:5-12.
- 28 沈晓帆, 王旗, 杨秀伟, 等. 七叶皂苷肾毒性及抗氧化剂的拮抗作用. *中国药理学与毒理学杂志*, 2008, 22(5):375-381.
- 29 江芳, 周昕睿, 王旗, 等. 补骨脂酚及其与补骨脂素联合的肾细胞毒性. *中国药理学与毒理学杂志*, 2010(in press).

Cell-based Approaches in Studying the Nephrotoxicity Induced by Components of Traditional Chinese Medicine

Wang Qi, Liu Qing, Shen Xiaofan, Jiang Fang

(Department of Toxicology, School of Public Health, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract: The nephrotoxicity induced by traditional Chinese medicine (TCM), which is attracting more attention, hinders TCM development and clinical application. To guarantee the safe application of TCM, it is essential to establish modern safety assessment approaches. During early toxicity screening, in vitro cytotoxicity assays were conducted to explore the cell-based approach for the safety assessment of TCM components. This paper briefly reviews the characteristics of renal tubular epithelial cells and the applications of cell-based approaches to in vitro study concerning the nephrotoxicity of TCM components. Perspectives are also presented regarding the use of renal tubular epithelial cells as an early safety assessment assay in TCM.

Keywords: TCM components, Nephrotoxicity, Cell-based, Safety assessment

(责任编辑:李沙沙, 责任译审:张立巍)