

## • 基础研究 •

白头翁皂苷 B4 对实验性急性肾功能损伤的保护作用<sup>△</sup>龚琴<sup>1,2</sup>, 王木兰<sup>2</sup>, 何鹿玲<sup>2</sup>, 冯育林<sup>1,2</sup>, 杨世林<sup>1,2</sup>, 杜力军<sup>2,3</sup>, 李俊<sup>1,2\*</sup>

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330006; 2. 创新药物与高效节能降耗制药设备国家重点实验室, 江西 南昌 330006;  
3. 清华大学 生命科学学院, 北京 100084

**[摘要]** 目的: 研究探讨白头翁皂苷 B4 对急性肾功能损伤的保护作用, 以及对其进行小鼠急性毒性评价。方法: 通过体外细胞实验, 以 LPS 诱导人胚肾细胞 HEK293 损伤模型, 用白头翁皂苷 B4 进行干预 24、48 h, MTT 法检测细胞活性及炎症因子的表达, 观察白头翁皂苷 B4 对肾细胞损伤的作用。整体动物实验, 分别以甘油、顺铂和脂多糖(LPS)造成大鼠或小鼠急性肾功能损伤, 尾静脉注射不同剂量的白头翁皂苷 B4, 给药一定时间后行眼眶采血, 分离血清, 检测反映肾功能指标的尿素氮(BUN)、肌酐(Cre)、总蛋白(TP)及尿液中蛋白含量, 来观察白头翁皂苷 B4 对急性肾功能损伤的作用; 给小鼠尾静脉注射不同剂量的白头翁皂苷 B4, 连续观察 2 周, 根据死亡率计算半数致死量(LD<sub>50</sub>), 初步评价白头翁皂苷 B4 的用药安全性。结果: 白头翁皂苷 B4 能提高损伤的肾细胞活性, 下调炎症因子 TNF- $\alpha$  的表达。白头翁皂苷 B4 静脉给药对甘油, 顺铂和 LPS 所导致的血清 BUN, Cre 升高均有明显的抑制作用, 同时白头翁皂苷 B4 高剂量(2.5 mg·kg<sup>-1</sup>)还可以明显降低甘油致急性肾损伤大鼠的尿蛋白浓度, 其在大鼠有效剂量为 1.25~2.5 mg·kg<sup>-1</sup>, 小鼠有效剂量为 5~10 mg·kg<sup>-1</sup>。白头翁皂苷 B4 对小鼠静脉给药的 LD<sub>50</sub> 为 3.36 g·kg<sup>-1</sup>, 95% 可信限为 3.34~3.37 g·kg<sup>-1</sup>, 根据小鼠最大给药剂量 20 mg·kg<sup>-1</sup>, 计算出其临床安全指数为 168(3.36/0.02), 具有较高的临床安全范围。结论: 白头翁皂苷 B4 对于实验性急性动物肾功能损伤具有明确的保护作用, 同时以其较大的临床安全指数提示该化合物具有较好的新药开发前景。

**[关键词]** 白头翁皂苷 B4; 肾损伤; 急性毒性; 人胚肾细胞 HEK293; 脂多糖; 甘油; 顺铂

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)01-0062-07

**doi:**10.13313/j.issn.1673-4890.20180703001

## Protective Effect of Anemoside B4 from Experimental Acute Renal Damage in Animal

GONG Qin<sup>1,2</sup>, WANG Mu-lan<sup>2</sup>, HE Lu-ling<sup>2</sup>, FENG Yu-lin<sup>1,2</sup>, YANG Shi-lin<sup>1,2</sup>, DU Li-jun<sup>2,3</sup>, LI Jun<sup>1,2\*</sup>

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China;

2. State Key Laboratory of Innovative Drugs and Efficient Energy-saving Pharmaceutical Equipment, Nanchang 330006, China;

3. School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effect of *Pulsatilla* saponin B4 on acute renal injury and acute toxicity in mice. **Methods:** *In vitro*, the cell experiments were performed to induce HEK293 injury model by LPS, and B4 was used for 24 and 48 hours. MTT assay was used to detect the activity of cells and the expression of inflammatory factors by qPCR to observe the effect of B4 on renal cell injury. The animal experiments were conducted in rats and mice. In pharmacological study, rats or mice were given glycerol, cisplatin, and lipopolysaccharide(LPS) respectively for acute renal injury. B4 was injected into the caudal vein at different doses. After given for a certain period of time, orbital blood was collected and the serum was separated. Serum BUN, creatinine(Cre), total protein(TP) and rat's urinary protein in rats were determined to evaluate the effect of B4 on the renal damage. In the acute toxicity, mice were injected intravenously with different doses of B4 for 2 weeks. According to the death, the half-lethal dose(LD<sub>50</sub>) was calculated. **Results:** B4 could increase the activity of injured renal cells and down-regulate the expression of inflammatory factor TNF- $\alpha$ . It also inhibit the increase of serum BUN, Cre induced by cisplatin and LPS caused by increased significantly. At the same time, B4 with high dose(2.5 mg·kg<sup>-1</sup>) could also significantly reduce rat urine protein concentration. Its effective dose were 1.25-2.5 mg·kg<sup>-1</sup> in rats, and 5-10 mg·kg<sup>-1</sup> in mice. The

<sup>△</sup> [基金项目] 国家创新药物“十三五”重大专项(2018ZX09301030-002)

\* [通信作者] 李俊, 博士, 副教授, 研究方向: 中药药理; E-mail: 21363492@qq.com

LD<sub>50</sub> for intravenous administration of B4 to mice was 3.36 g·kg<sup>-1</sup> and the 95% confidence limit was 3.34 to 3.37 g·kg<sup>-1</sup>. And therefore, the clinical safety index of B4 was 168(3.36/0.02) based on the maximum dose of 20 mg·kg<sup>-1</sup> in mice, showing B4 has a high clinical safety range. **Conclusion:** B4 has definite protective effect on experimental acute renal impairment, and meanwhile its large clinical safety index suggests that this compound has a good prospects for the development of new drugs.

[**Keywords**] nemoside B4; renal damage; acute toxicity; human embryonic kidney cells HEK293; LPS; glycerin; cisplatin

白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel 是临床常用中药, 具有清热解毒、止痢、燥湿的作用。常用于湿热痢疾等湿热证<sup>[1]</sup>。白头翁中分离得到多种皂苷类化合物<sup>[2-4]</sup>, 这类化合物具有抗炎、抑瘤等作用<sup>[5-13]</sup>。白头翁皂苷 B4(简称 B4)为白头翁皂苷中主要单体成分之一, 属五环三萜皂苷类化合物, 结构母核为 23-羟基白桦酸。国内外对于 B4 的药理研究报道甚少, 仅见少量关于抗肝癌、抗炎作用的体外细胞实验研究, 以及 B4 在溃疡性结肠炎大鼠体内药代动力学相关实验研究, 对于急性肾损伤尚未见有相关报道。我们在前期研究中发现, 白头翁中含量较高的主要成分白头翁皂苷 B4 具有较好的抗炎作用, 对于体外脂多糖(LPS)所致人胚肾细胞 HEK293 损伤具有一定的防治作用。为进一步证明 B4 具有防治肾功能损伤的作用, 本团队利用多种常用方法所致动物急性肾功能损伤模型, 从整体动物水平进一步确证 B4 的相关药效, 同时还进行了小鼠 LD<sub>50</sub> 的测定, 以期全面反映该药潜在的研究开发价值。

## 1 材料

### 1.1 细胞株

HEK293、人胚肾细胞(中国科学院上海生命科学研究院细胞库)。

### 1.2 动物

SD 大鼠, 体质量 160~220 g, 雄性, 用于甘油所致大鼠急性肾损伤实验; ICR 小鼠, 体质量 16~18 g, 雄性, 用于顺铂所致急性肾损伤实验; Balb/c 小鼠, 体质量 21~23 g, 雄性, 用于 LPS 致急性肾损伤实验; ICR 小鼠, 体质量 18~22 g, 雄雌各半, 用于急性毒性实验。上述大小鼠均购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号: SCXK(湘)2016-0002(小鼠), 许可证号: SCXK(湘)2013-0004(大鼠)。

### 1.3 药物与试剂

白头翁皂苷 B4(anemoside B4, C<sub>59</sub>H<sub>96</sub>O<sub>26</sub>, 分子量: 1221.39, PubChem CID: 11636713, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71307558>, 分

子结构式见图 1。), 由本室植化组提供, 纯度大于 98%(HPLC 法), 批号: 20161107。

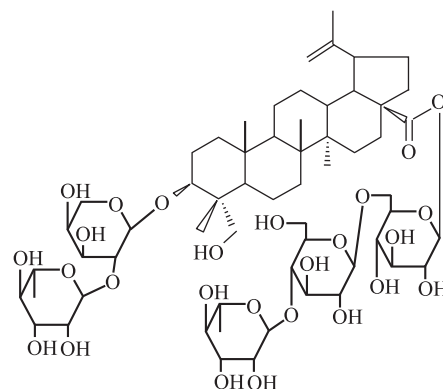


图 1 白头翁皂苷 B4 化学结构

地塞米松, 0.75g/片, 安徽金太阳生化药业有限公司, 批号: 15032521。甘油(西陇化工股份有限公司, AR, 含量 > 99%, 批号: 160320, 临用前取甘油加等量的 0.9% 氯化钠溶液稀释成 50% 甘油溶液备用。顺铂(江苏豪森药业集团有限公司, 5 mg·mL<sup>-1</sup>, 批号: 170503), 临用前用 0.9% 氯化钠溶液配成 1.5 mg·mL<sup>-1</sup> 溶液备用。脂多糖(LPS, Sigma 公司, Lipopolysaccharides from Escherichia coli O555: B5, L2880-100MG, 批号: 017M4112V), 临用前用 0.9% 氯化钠溶液配成 1.0 mg·mL<sup>-1</sup> 溶液备用。BUN、TP 生化试剂盒(日本纯药工业株式会社, 批号分别为 TR368、DF774)。Cre 生化试剂盒(北京利德曼生化股份有限公司, 批号: 7082216)。Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(P0006, 北京碧云天生物技术公司)。DMEM/HIGH GLUCOSE 培养基(Hyclone, LOT No: AC10253739)。澳洲胎牛血清(Hyclone, 货号: SH30084.03)。TRIzol(ambion 公司), LOT: 15991210。Realtime PCR Super mix(MF013-01, 北京聚合美生物科技有限责任公司, LOT: 20170911)。引物由金斯瑞生物科技有限公司合成, 基因序列如下: GAPDH, forward, 5'-GGTACTAACCCTGCGCT-3', reverse, 5'-TGACCAGGCGCCCAATAC-3'。TNF-α, forward, 5'-AGCACTGAAAGCATCATCCG-3', reverse, 5'-CCGATCACTCCAAAGTGCA-3'。

## 1.4 仪器

Spectra Max i3 型多功能酶标仪 (Molecular Devices 公司), 7100 型全自动生化分析仪 (日立公司), TDZ4 型台式低速离心机 (长沙湘智离心机仪器有限公司), 超净工作台 [日本, SANYO MCV-B161S(T)], CO<sub>2</sub> 培养箱 (日本, SANYO MCO-20ACI), 倒置显微镜 (日本, OLYMPUS CKX41), 7500 荧光定量 PCR 仪 (AB 公司), 5810R 冷冻离心机 (德国 Eppendorf)。

## 2 方法

### 2.1 B4 抗 LPS 致 HEK293 细胞损伤

用 DMEM 高糖培养基将细胞复苏、传代, 取对数生长期细胞, 经消化后收集细胞接种于 96 孔板中, 细胞密度为  $4.5 \times 10^4$  个/mL, 每孔接种 100  $\mu$ L, 置 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h, 弃去细胞上清液加入 100  $\mu$ L 终质量浓度 10  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup> 的 LPS 诱导损伤, 24 h 后加入 B4 干预, B4 终质量浓度为 1、10、100  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>, 同时设置正常组 (即不加 LPS 和 B4) 及模型组 (即加 LPS 不加 B4)。MTT 法检测给药 24 h 和 48 h 细胞的活性 (细胞活性 = 给药组平均吸光度/正常组平均吸光度  $\times$  100%)。以上同样方法 LPS 诱导细胞损伤, 收集 B4 给药 24、48 h 的细胞, 按照试剂盒操作说明制备 mRNA, 并进行 qPCR 检测细胞中 TNF- $\alpha$  的表达。

### 2.2 B4 抗甘油所致大鼠急性肾功能损伤

取雄性 SD 大鼠, 随机分为 6 组, 每组 10 只。正常组、模型组、阳性组 (地塞米松 0.3 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>)、B4 高剂量组 (2.5 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>)、B4 中剂量组 (1.25 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>)、B4 低剂量组 (0.625 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>)。造模前禁水 24 h, 造成动物脱水, 按 10 mL $\cdot$ kg<sup>-1</sup> 的体积分别在大鼠两后肢内侧肌肉内注射 50% 甘油溶液, 复制急性肾损伤模型, 造模后恢复饮水<sup>[14-15]</sup>。从造模当天开始连续给药 4 d, 正常组、阳性组灌胃给药 (给药容积 10 mL $\cdot$ kg<sup>-1</sup>), 模型组、B4 组尾静脉注射 (给药容积 5 mL $\cdot$ kg<sup>-1</sup>)。末次给药后 1 h, 大鼠异氟烷麻醉后眼球取血, 分离血清, 采集膀胱尿, 检测总蛋白 (TP)、尿素氮 (BUN)、肌酐 (Cre)、尿蛋白。

### 2.3 B4 抗顺铂所致小鼠急性肾功能损伤

取雄性 ICR 小鼠, 随机分为 6 组。按顺铂 15 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> 的剂量造模, 正常组腹腔注射 0.9% 氯化钠溶液, 其他组腹腔注射顺铂注射液<sup>[16]</sup>。阳性组地塞米松

给药剂量为 0.5 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> (灌胃给药, 给药容积 20 mL $\cdot$ kg<sup>-1</sup>), B4 给药剂量分别为 10 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>、5 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>、2.5 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> (尾静脉注射, 注射容积 10 mL $\cdot$ kg<sup>-1</sup>), 模型组尾静脉注射等容积的 0.9% 氯化钠溶液, 正常组灌胃等容积双蒸水。从造模当天开始连续给药 4 d, 末次给药后 1 h 眼球取血, 分离血清, 全自动生化分析仪上检测总蛋白 (TP)、尿素氮 (BUN)、肌酐 (Cre)。

### 2.4 B4 抗 LPS 所致小鼠急性肾功能损伤

取雄性 Balb/c 小鼠, 随机分为 6 组, 每组 15 只。LPS 静脉注射造模 (剂量 10 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>)<sup>[17]</sup>。造模后 6 h, 各组给予不同剂量的药物, 经过多次预试验, 最终确定 B4 给药剂量分别为 20、10、5 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> (尾静脉注射, 给药容积 10 mL $\cdot$ kg<sup>-1</sup>), 阳性组地塞米松给药剂量为 0.5 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> (灌胃给药, 容积 20 mL $\cdot$ kg<sup>-1</sup>)。模型组腹腔注射等容积 0.9% 氯化钠溶液, 正常组灌胃等容积的双蒸水。给药后 6 h (即造模后 12 h) 眼眶取血, 分离血清, 检测总蛋白 (TP)、尿素氮 (BUN)、肌酐 (Cre)。

### 2.5 小鼠急性毒性实验

取 ICR 小鼠 60 只, 雄雌各半。随机分为 6 组, 每组 10 只。对照组、B4 的 5 个剂量组, 剂量分别为 6、4.8、3.84、3.07、2.46 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup>, 每组组间剂量比为 1:0.8。B4 各剂量组尾静脉注射不同剂量的药物, 给药容积为 20 ~ 25 mL $\cdot$ kg<sup>-1</sup>, 对照组注射 20 mL $\cdot$ kg<sup>-1</sup> 体积的 0.9% 氯化钠溶液, 给药 1 次, 观察 2 周。给药后观察动物体质量变化 (每周称一次)、饮食、外观、行为、分泌物、排泄物、死亡情况 (记录累积死亡数) 及中毒反应 (中毒反应的症状、严重程度、起始时间、持续时间、是否可逆) 等。对濒死及死亡动物及时进行大体解剖, 其他动物在观察期结束后进行大体解剖, 观察动物主要脏器肝、脾脏、胸腺、肾、肺、心脏、小肠、胃等, 对异常脏器进行组织病理学检查。根据死亡数计算死亡率, 计算半数致死量 (LD<sub>50</sub>) 及 95% 可信限。

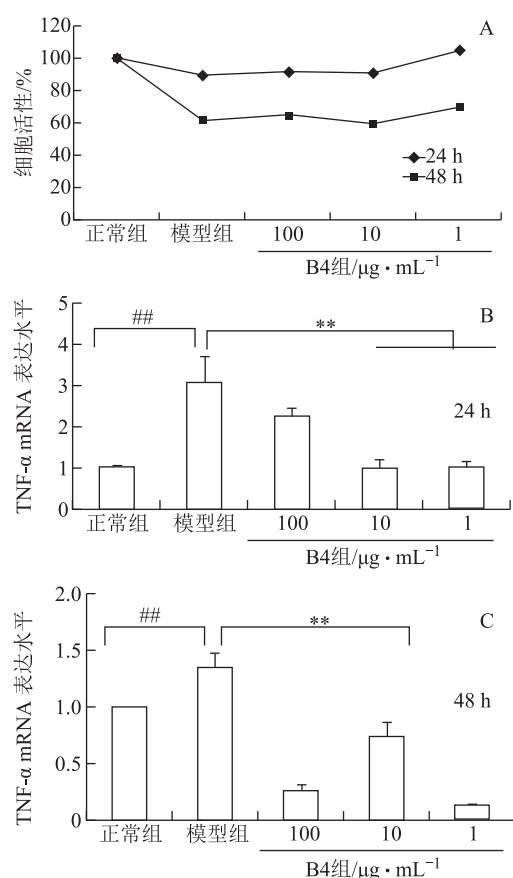
### 2.6 数据分析

所得数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。以 Office 2010 Excel 软件对数据进行处理。采用单因素方差分析, 差异具有统计学意义后, 再进行两两 *t* 检验。以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义 (急性毒性实验数据采用冠氏法进行分析<sup>[18]</sup>)。

### 3 结果

#### 3.1 B4 对 LPS 致 HEK293 细胞损伤的影响

结果显示,  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 LPS 诱导 24 h 后细胞活性明显下降, 且炎症因子  $\text{TNF-}\alpha$  表达显著上调, B4 给药 24、48 h 后剂量  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  可明显增加细胞活性, 且  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  及  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  能明显下调  $\text{TNF-}\alpha$  mRNA 的表达, 提示 B4 对 LPS 诱导的肾细胞损伤有一定的保护作用(见图 2)。



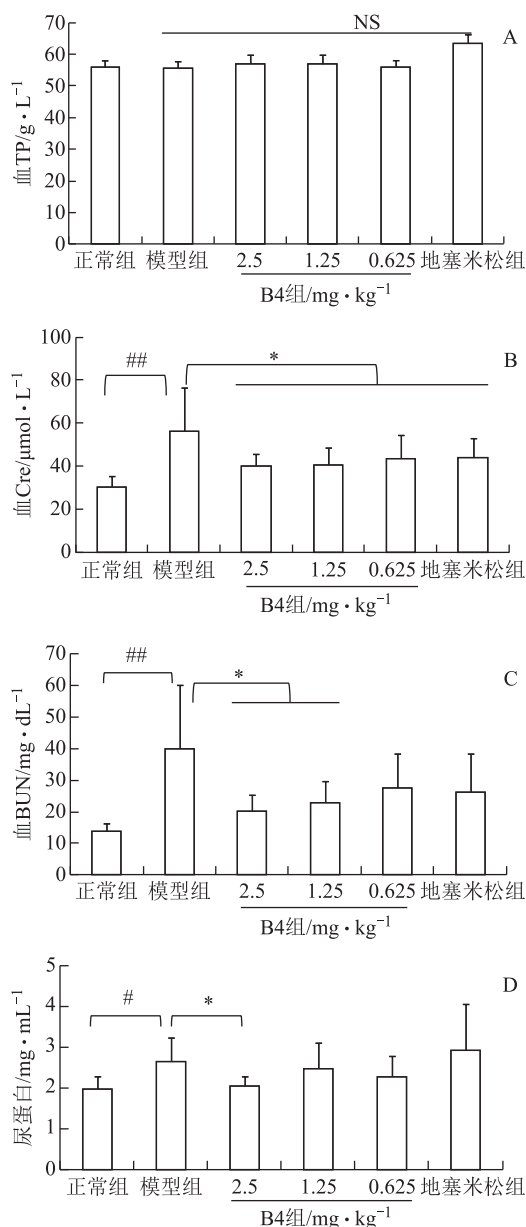
注: A. B4 对 LPS 致 HEK293 损伤细胞活性的影响; B. B4 给药 24 h 对 LPS 致细胞损伤  $\text{TNF-}\alpha$  mRNA 表达的影响; C. B4 给药 48 h 对 LPS 致细胞损伤  $\text{TNF-}\alpha$  mRNA 表达的影响; 与正常组比较,  $^{##}P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $^{**}P < 0.01$ 。

图 2 B4 对 LPS 致 HEK293 细胞损伤的保护作用( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

#### 3.2 B4 对甘油所致大鼠肾功能损伤的影响

模型组血清中 BUN、Cre 及其尿蛋白较正常组明显升高。B4 静脉给药后高、中剂量组大鼠血清 BUN、Cre 明显下降, 与模型组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。B4 高剂量组大鼠尿蛋白浓度明显下降( $P < 0.05$ ), 表明 B4 对甘油所致大鼠急性肾损伤

有一定的保护作用。阳性对照药地塞米松也在一定程度上保护肾功能, 但对尿蛋白无明显作用, 各组大鼠血清总蛋白量差异无统计学意义(见图 3)。



注: A. B4 对 TP 的影响; B. B4 对 Cre 的影响; C. B4 对 BUN 的影响; D. B4 对尿蛋白的影响; 与正常组比较,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{##}P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $^{*}P < 0.05$ ; NS 表示差异无统计学意义。

图 3 B4 对甘油所致大鼠急性肾功能损伤的保护作用( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

#### 3.3 B4 对顺铂所致小鼠肾功能损伤的影响

模型组血清中 BUN、Cre 较正常组明显升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。B4 ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、B4 ( $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 组血清 BUN、Cre 明显下降, 与模型组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 提示 B4 对顺

铂所致急性肾损伤有一定的保护作用,能显著降低急性肾损伤时的BUN、Cre。阳性组血清BUN明显下降( $P < 0.05$ ),对Cre无明显作用。B4各组小鼠血清总蛋白量无明显差异。结果见表1。

表1 B4对顺铂所致小鼠急性肾功能损伤的影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | 剂量/<br>$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ | n  | TP/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | BUN/ $\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ | Cre/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ |
|------|-----------------------------------------|----|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------|
| 正常   |                                         | 10 | 49.6 ± 2.3                         | 25.1 ± 4.3                            | 25.6 ± 4.0                               |
| 模型   |                                         | 15 | 48.3 ± 3.2                         | 62.0 ± 31.0 <sup>#</sup>              | 29.7 ± 3.7 <sup>#</sup>                  |
| B4   | 10.0                                    | 12 | 46.2 ± 2.5                         | 38.1 ± 18.9 <sup>*</sup>              | 25.4 ± 7.1 <sup>*</sup>                  |
| B4   | 5.0                                     | 12 | 46.6 ± 2.3                         | 28.4 ± 14.3 <sup>*</sup>              | 24.1 ± 3.8 <sup>*</sup>                  |
| B4   | 2.5                                     | 12 | 47.6 ± 2.5                         | 69.3 ± 45.8                           | 29.3 ± 5.7                               |
| 地塞米松 | 0.5                                     | 12 | 52.9 ± 2.5 <sup>**</sup>           | 36.4 ± 20.4 <sup>*</sup>              | 30.1 ± 3.9                               |

注:与正常组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

### 3.4 B4对LPS所致小鼠肾功能损伤的影响

模型组静脉注射LPS 12 h后,小鼠血清总蛋白明显下降,BUN和Cre明显升高,与正常组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。给药后6 h,B4的3个剂量组血清BUN明显降低,与模型组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),但对Cre则未表现出明显的作用。阳性药对血清BUN也表现出明显的下调作用。结果见表2。

表2 B4对LPS致小鼠急性肾功能损伤的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 15$ )

| 组别   | 剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ | TP/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | BUN/ $\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ | Cre/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ |
|------|--------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------|
| 正常   |                                      | 53.8 ± 1.5                         | 21.4 ± 4.7                            | 13.9 ± 2.0                               |
| 模型   |                                      | 43.6 ± 1.7 <sup>##</sup>           | 67.2 ± 6.4 <sup>##</sup>              | 19.1 ± 2.0 <sup>##</sup>                 |
| B4   | 20.0                                 | 43.0 ± 1.6                         | 58.6 ± 16.2 <sup>*</sup>              | 19.1 ± 2.0                               |
| B4   | 10.0                                 | 44.1 ± 2.1                         | 50.3 ± 13.7 <sup>**</sup>             | 19.8 ± 4.4                               |
| B4   | 5.0                                  | 44.9 ± 1.4 <sup>*</sup>            | 55.6 ± 19.5 <sup>*</sup>              | 21.9 ± 2.3                               |
| 地塞米松 | 0.5                                  | 45.2 ± 1.9 <sup>**</sup>           | 55.3 ± 20.1 <sup>*</sup>              | 20.0 ± 3.1                               |

注:与正常组比较,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

### 3.5 小鼠急性毒性实验

静脉注射不同剂量的B4,各组小鼠表现出不同的反应。I、II、III、IV剂量组动物给药后自主活动减少,对外反应冷漠,部分动物出现竖毛、消瘦等现象。剂量I、II组动物死亡时间主要集中在给药后24~36 h,剂量III组死亡时间在给药后36 h,

剂量IV组动物死亡时间为给药后72 h内,V剂量组无动物死亡。各组小鼠死亡率见表3。采用寇氏法计算,B4静脉注射给药小鼠LD<sub>50</sub>值为3.36  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,95%可信限为3.34~3.37  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

表3 B4静脉注射给药所致小鼠死亡率

| 组别      | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | n  | 死亡数   | 死亡率/% |
|---------|-------------------------------------|----|-------|-------|
| 对照组     |                                     | 10 | 0     | 0     |
| I(B4)   | 6.00                                | 10 | 10(5) | 100   |
| II(B4)  | 4.80                                | 10 | 10(5) | 100   |
| III(B4) | 3.84                                | 10 | 10(5) | 100   |
| IV(B4)  | 3.07                                | 10 | 1(1)  | 10    |
| V(B4)   | 2.46                                | 10 | 0     | 0     |

注:“( )”为雌性小鼠死亡数。

## 4 讨论

本研究利用甘油、顺铂和LPS造模,观察了B4对急性肾功能损伤的保护作用。甘油引起急性肾功能损伤的原理是肌肉注射甘油后,由于禁水及甘油的高渗透压造成局部体液蓄积而引起血容量降低,肾血流量减少,血液黏度增加,肾血管阻抗增加,血管自身调节功能丧失,导致肾小球滤过率下降。另外,高渗透压造成肌肉及肌肉血管的溶解,肌红蛋白、血红蛋白及钾的释放产生肾毒性最终造成肾小球及肾小管损伤<sup>[19-21]</sup>。顺铂为一临床常用的非特异性抗肿瘤药,其细胞毒性对肿瘤进行杀伤的同时,也不可避免地对正常组织细胞产生毒性,因此顺铂在抗肿瘤过程中常导致肾功能损伤已为临床所常见<sup>[22]</sup>。腹腔注射顺铂后,可引起肾血管收缩,肾血流量及肾小球滤过率下降,从而引起蛋白尿、肾功能损伤等症状<sup>[23-24]</sup>,对肾脏的不同部位均有毒性,可使肾小球、肾小管功能及形态学改变。LPS诱导的急性肾损伤是其通过激活TLR2/4信号通路,刺激组织细胞炎性坏死因子表达,进而对正常组织细胞产生损伤,其中以肾功能损伤较为明显<sup>[25-27]</sup>。我们利用上述3种常规方法对B4防治急性实验性肾功能损伤的作用进行了观察,结果表明,B4对这3种模型的急性肾功能损伤均有明显的保护作用,同时根据体外LPS致人胚肾细胞损伤实验结果显示B4对LPS所致炎症反应有明显抑制作用,提示该药在此方面的潜在的药用价值。

急性肾损伤主要是炎性坏死病理反应,其中最常发生变化的就是TLR4及其下游信号通路,如核

因子 NF- $\kappa$ B 及炎症因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 等。近年来,越来越多的研究表明,Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)在多种肾脏疾病中发挥着重要的作用,尤其是 TLR2 和 TLR4<sup>[28]</sup>。综合文献关于 B4 具有抗炎抗癌作用以及抗溃疡性结肠炎的药代相关研究报道,可见 B4 对于炎症反应具有一定抑制作用。同时本研究在甘油致大鼠的急性肾损伤的实验中发现,B4 可降低肾损伤大鼠尿液中白蛋白量,提示其对肾小球滤过功能有一定的修复作用,对于 B4 抗肾损伤作用机制研究可从改善肾小球滤过功能,如肾小球基底膜上的足细胞等方面开展。关于 B4 对急性肾损伤的保护作用机制有待进一步深入研究。

在急性肾功能损伤模型的实验中,B4 对不同原因的模型所用剂量不同。其中对 LPS 所致急性肾功能损伤的有效剂量在 5~20 mg·kg<sup>-1</sup>。而对顺铂所致急性肾功能损伤的有效剂量在 5~10 mg·kg<sup>-1</sup>,2.5 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量未表现出明显的作用。在甘油所致大鼠急性肾功能损伤模型实验中,B4 的有效剂量在 1.25~2.50 mg·kg<sup>-1</sup>,按照大小鼠体表面积计算,此剂量相当于小鼠的 2.5~5.0 mg·kg<sup>-1</sup>。由此提示对于实验性急性肾功能损伤模型实验中,B4 的有效剂量在 5~20 mg·kg<sup>-1</sup>,当然最终有效剂量的确定还需要更多实验的验证,其中对慢性肾功能损伤的作用有待于进一步研究。

小鼠以 B4 静脉给药,LD<sub>50</sub> 为 3.36 g·kg<sup>-1</sup>,毒性较小。以最大有效剂量 20 mg·kg<sup>-1</sup> 计,B4 的临床安全指数(safety index)为 168(3.36/0.02),提示 B4 在防治急性肾功能损伤方面的安全系数较大。在急性毒性实验中可见,B4 毒性的产生有一个关键节点,即剂量在 3.84~3.07 mg·kg<sup>-1</sup> 时,剂量为 3.84 mg·kg<sup>-1</sup> 时,小鼠死亡率为 100%;而剂量降至 3.07 mg·kg<sup>-1</sup> 时,小鼠死亡率明显下降至仅为 10%。B4 表现出毒性的骤然性变化,其中的机制尚待于进一步研究。

综上,B4 以其毒性较低、治疗指数较高等特点,在防治急性肾功能损伤方面具有一定的药用开发价值,本工作提供了重要的实验参考。

### 参考文献

- [1] 梁勇满,赵容,许亮,等.中药白头翁本草考证与中国白头翁属植物分类[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(5):203-209.
- [2] JIN M M,ZHANG W D,XU Y M,et al. Simultaneous determination of 12 active components in the roots of Pulsatilla

chinensis using tissue-smashing extraction with liquid chromatography and mass spectrometry[J]. J Sep Sci, 2017, 40(6):1283-1292.

- [3] 管咏梅,孙振,张文秀,等.白头翁总皂苷提取物的基本理化性质考察[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(14):41-44.
- [4] 俞冰莹,饶毅,杨世林,等.白头翁提取物中总皂苷及皂苷类成分的测定[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(15):65-68.
- [5] 杨连荣,张丽杰,姚姣姣,等.白头翁皂苷 B4 在正常大鼠和溃疡性结肠炎大鼠体内组织分布情况的比较[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(21):93-97.
- [6] 缪成贵,周国梁,秦梅颂,等.白头翁皂苷对佐剂性关节炎大鼠 FZD8 表达的影响[J].中国中药杂志,2015,40(20):4063-4067.
- [7] XU Q M,SHU Z,HE W J,et al. Antitumor activity of Pulsatilla chinensis (Bunge) Regel saponins in human liver tumor 7402 cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Phytomedicine, 2012,19(3/4):293-300.
- [8] 陈凯,张文明,喻凯,等.白头翁中抗肿瘤物质的筛选及其作用机制研究[J].天然产物研究与开发,2016,28(12):1875-1879.
- [9] 罗颖颖,陈兰英,简晖,等.白头翁皂苷调节 Bel-7402 人肝癌异体移植瘤裸鼠能量代谢的研究[J].中草药,2014,4(7):973-977.
- [10] 罗颖颖,陈兰英,崔亚茹,等.白头翁皂苷抑制人 HT29 结肠癌细胞增殖及诱导凋亡作用研究[J].中药药理与临床,2013,29(5):52-56.
- [11] LIU M,ZHAO X,XIAO L,et al. Cytotoxicity of the compounds isolated from Pulsatilla chinensis saponins and apoptosis induced by 23-hydroxybetulinic acid[J]. Pharm Biol, 2015,53(1):1-9.
- [12] CHEN Z,GUAN Y,ZHOU L,et al. Preparation and Characterization of Colon-Targeted Particles of Pulsatilla chinensis Saponins[J]. Nat Prod Commun, 2015,10(2):237-238.
- [13] 罗颖颖,严新,谢欣序,等.白头翁总皂苷及其主要成分抗肿瘤药效及其构效关系的研究[J].中国现代中药,2018,20(7):791-796.
- [14] 杨浩强,黄向阳,孟晓燕,等.IL-18、TNF- $\alpha$ 、CRP 在甘油致大鼠急性肾损伤中的变化及意义[J].海南医学,2015,26(17):2506-2509.
- [15] 赵晓琴,刘唐威,邝晓聪.甘油致大鼠急性肾功能衰竭肾小管细胞凋亡的动态实验观察[J].中华急诊医学杂志,2003,12(3):167-170.
- [16] 董思敏,王海璐,王全凯,等.鹿茸水提物减轻顺铂所致的小鼠肾损伤[J].中国病理生理杂志,2016,32(8):1466-1470.

(下转第 70 页)

分茎叶枯萎后,或早春发芽前采挖。选择晴天采挖,将挖取的根茎去除地上部分残茎,抖去泥土,晒干后撞去须泥或晒至八九成干时用微火燎掉毛须即可。均以个大、质坚实、朱砂点多香气浓者为佳。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2] 胡世林. 苍术的本草考证[J]. 中国医药学报,2001,16(1):11.
- [3] 张全垂,徐连明,陈刚. 中国茅苍术研究进展及存在问题[J]. 时珍国医国药,2004,15(11):781-782.
- [4] 段国锋,欧阳臻,樊一桥,等. 茅苍术多糖防治小白鼠高血糖的实验研究[J]. 中华中医药学刊,2008,26(6):1211-1212.
- [5] 丁立威. 苍术价格暴涨探因[J]. 中国现代中药,2010,12(2):42-44.
- [6] 孙宇章,郭兰萍,黄璐琦,等. 茅山地区苍术的分布现状分析[J]. 中药材,2008,31(5):641-645.
- [7] 王秋玲,郭旭,刘福清,等. 北苍术开花结实特性观察及种子分级研究[J]. 中国现代中药,2015,17(6):568-571.
- [8] 李世清,李东方,李凤民,等. 半干旱农田生态系统地膜覆盖的土壤生态效应[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2003,31(5):21-29.
- [9] 邹廷伟,周洁,周冰谦,等. “垄式+覆盖+覆膜”栽培模式对黄芩生物量和有效物质积累的影响[J]. 中国现代中药,2016,18(2):181-184.
- [10] 李毅,王文焰,门旗,等. 宽地膜覆盖条件下土壤温度场特征[J]. 农业工程学报,2001,17(3):32-36.
- [11] 金胜利,周立敏,李凤民,等. 黄土高原地区玉米双垄全膜覆盖沟播栽培技术土壤水温条件及其产量效应[J]. 干旱地区农业研究,2010,28(2):28-33.
- [12] 肖文中,邓展来. 不同栽培方式对青蒿生长情况及产量和青蒿素含量的影响[J]. 中国现代中药,2008,10(4):44-45.
- [13] 夏自强,蒋洪庚,李琼芳,等. 地膜覆盖对土壤温度、水分的影响及节水效益[J]. 河海大学学报:自然科学版,1997,25(2):39-45.

(收稿日期:2018-07-06 编辑:姚霞)

(上接第67页)

- [17] 朱方强,江军,黄宏. 姜黄素抑制内毒素所致小鼠急性肾功能损害的作用[J]. 第三军医大学学报,2005,27(11):1074-1077.
- [18] 杨树勤. 中国医学百科全书:医学统计学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1992:196-204.
- [19] 赵晓琴,刘唐威,邝晓聪,等. 甘油致大鼠急性肾功能衰竭肾小管细胞凋亡的动态实验观察[J]. 中华急诊医学杂志,2003,12(3):167-170.
- [20] 郭德玉,李斌,张丽,等. 甘油致急性肾功能衰竭大鼠模型[J]. 中国实验动物学杂志,1997,7(4):212-215.
- [21] 梁正林,邝晓聪,温冠媚,等. 大鼠急性肾功能衰竭中细胞凋亡的实验观察及其意义[J]. 广西医科大学学报,2008,25(1):25-26.
- [22] 钱超. 癌症患者顺铂化疗相关肾毒性的临床进展[J]. 实用癌症杂志,2014,29(5):607-609.
- [23] 张静,周文. 顺铂肾毒性相关机制及其防护研究现状[J]. 中国药理学杂志,2012,47(22):1785-1789.
- [24] 孟晓燕. 顺铂致急性肾损伤的研究进展[J]. 医学综述,2014,20(21):3949-3951.
- [25] 朱晓玲, LiKe, 王永钧,等. LPS对BALB/C小鼠肾小管上皮细胞TLR4和TNF $\alpha$ 、IL-6表达的影响[J]. 医学研究杂志,2008,37(1):40-43.
- [26] 袁玉荣. Toll样受体4在急性肾功能衰竭中的作用[J]. 黑龙江医药,2010,23(6):907-910.
- [27] 孙佳,夏海鸣. 内毒素休克大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、皮质醇、LPS的测定及肾上腺的病理改变[J]. 东南大学学报(医学版),2011,30(5):728-732.
- [28] KELLUM A J, PROWLE J R. Paradigms of acute kidney injury in the intensive care setting[J]. Nat Rev Nephrol, 2018,14(4):217-230.

(收稿日期:2018-08-20 编辑:王丽英)