

基于 MDCK II 细胞的中药成分体外肾毒性评价

刘庆¹, 王旗^{1*}, 杨秀伟², 张宝旭¹

(北京大学 1. 公共卫生学院毒理学系, 2. 药学院天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083)

摘要: 目的 用狗肾近端小管上皮(MDCK II)细胞系研究中药成分的肾毒性,探讨其作为评价中药成分肾毒性体内动物实验替代方法的可能性。方法 以氯化汞(HgCl₂)为阳性对照,研究已知有肾毒性的马兜铃酸 I(AA I)和马兜铃酸 II(AA II),以及未见肾毒性报道的苦参碱、氧化苦参碱和肉豆蔻醚对 MDCK II 细胞的毒性作用。用 MTT 法检测细胞存活;倒置显微镜观察细胞形态改变;乳酸脱氢酶(LDH)释放实验检测细胞膜损伤;流式细胞术分析细胞周期及细胞凋亡,用 Hoechst 33258 染色法观察凋亡细胞形态变化。结果 AA I 和 AA II 分别与 MDCK II 细胞作用 24, 48 和 72 h 细胞存活均被明显抑制,AAI 的 IC₅₀ 值分别为 (63.4 ± 6.6), (44.8 ± 6.0) 和 (37.3 ± 4.6) μmol·L⁻¹, AA II 的 IC₅₀ 值分别为 (125.7 ± 6.2), (106.7 ± 20.4) 和 (94.2 ± 9.7) μmol·L⁻¹;在 5 ~ 300 μmol·L⁻¹ 时 AA I 和 AA II 分别与 MDCK II 细胞作用 24 h, LDH 的释放率明显增高;AA I (75 μmol·L⁻¹) 和 AA II (150 μmol·L⁻¹) 分别与 MDCK II 细胞作用 24 h, 倒置显微镜下可见细胞收缩变圆,部分细胞破裂脱落;用流式细胞仪和 Hoechst 33258 染色法观察亦发现,AA I 和 AA II 均可使细胞周期 S 期阻滞,诱导 MDCK II 细胞发生凋亡。苦参碱、氧化苦参碱和肉豆蔻醚在 2 ~ 10 mmol·L⁻¹ 浓度范围内分别与 MDCK II 细胞作用 24 h, 对上述指标均无明显影响。结论 MDCK II 细胞系对有肾毒性的 AA I 和 AA II 和未见肾毒性报道的苦参碱、氧化苦参碱和肉豆蔻醚的反应不同,可用于中药成分体外肾毒性评价。

关键词: 肾; 毒性; MDCK II 细胞; 中草药

收稿日期: 2007-01-08 接受日期: 2007-08-12

基金项目: 北京科技计划项目(Z0004105040311)

作者简介: 刘庆(1982-),女,山东济宁人,硕士研究生,研究方向为毒理学研究。

* 联系作者 E-mail: wangqi@bjmu.edu.cn Tel: (010) 82801527

中图分类号: R285.5, R965.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2007)06-0521-08

近来,中药所致肾脏损伤日益受到人们重视。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],中药肾毒性已成为中药研究开发和临床应用的障碍,进行中药肾毒性早期筛选至关重要。

研究药物肾毒性的传统方法多采用动物实验,但动物实验所需样品和动物量大,提取、分离并纯化大量中药成分比较困难,实验成本高。近年来,多种体外细胞培养体系已成为药物肾毒性研究的有力工具,用培养细胞进行体外毒性分析已发展为早期肾毒性评价的重要替代方法,在中药新药开发早期建立有效的体外评价体系更是高通量筛选的手段之一。

肾近端小管是药物肾毒性损伤最常见的部位。用狗肾近端小管上皮(Madin-Darby canine kidney type II, MDCK II)细胞系可进行药物肾毒性研究,如抗肿瘤药顺铂、NPC-14686、环磷酰胺及其异构体异环磷酰胺的肾毒性^[2-4]。近年来应用 MDCK 细胞研究了氯化汞(HgCl₂)的肾毒性及其机制,研究表明 MDCK 细胞对典型的肾毒物 HgCl₂ 特别敏感^[5-8],但用 MDCK II 细胞进行中药成分肾毒性的研究尚未见报道。本研究以 HgCl₂ 作为阳性对照,用 MDCK II 细胞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)及未发现肾毒性的苦参碱(matrine)、氧化苦参碱(oxyamatrine)和肉豆蔻醚(myristicin)5 种中药成分的体外肾毒性,以探讨 MDCK II 细胞用于中药成分肾毒性筛选的可能性。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

AA I、AA II、苦参碱、氧化苦参碱和肉豆蔻醚

由北京大学药学院天然药物及仿生药物国家重点实验室杨秀伟教授惠赠,经高效液相色谱分析纯度均大于99%。AA I 和 AA II 用 DMSO (终浓度为0.5%) 溶解,配成 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液,用 DMEM 培养液 (Dulbecco's modified Eagle medium, 高糖, 碳酸氢钠 $3.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 稀释至实验浓度;苦参碱、氧化苦参碱和肉豆蔻醚直接用 DMEM 培养液配成相应浓度。DMEM 培养基和 HEPES, 美国 Gibco Invitrogen 公司; 优等级胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和非必需氨基酸, 美国 Hyclone 公司; 氯化汞 (HgCl_2)、MTT、碘化丙啶 (propidium iodide, PI)、RNA 酶和 Hoechst 33258, 美国 Sigma 公司; 胰蛋白酶, 美国 Amresco 公司; 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 其他试剂为国产分析纯试剂。

1.2 主要仪器

CO_2 培养箱, HERAcell250, 德国 Heraeus 公司; 倒置显微镜, TE2000-S, 日本 Nikon 公司; 数字摄像机, DXM1200F, 日本 Nikon 公司; 酶标仪, Model550, 美国 Bio-Rad 公司; 流式细胞仪, FASCAN, 美国 Becton-Dickinson 公司; 激光诱导扫描共聚焦显微镜, TCS SP2, 德国 Leica 公司。

1.3 细胞培养

MDCK II 细胞由北京大学药学院化学生物学系杨晓达教授惠赠, 采用 DMEM 培养基培养, 内含 10% 胎牛血清, 1% 非必需氨基酸, $100 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素, 于 5% CO_2 、恒湿和 37°C 条件下培养, 80% 融合后用胰酶/EDTA 消化液消化, 2~3 d 传代 1 次。

1.4 MTT 法检测细胞存活

参考文献[9]方法, 取对数生长期细胞消化成单细胞悬液, 调节细胞密度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 以每孔 100 μL 接种于 96 孔细胞培养板。24 h 后弃去培养液, 加入稀释于 DMEM (无 FBS) 的 HgCl_2 (根据预实验结果, 选用 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 5 种中药成分 (AA I 和 AA II 的浓度分别为 5, 25, 75, 150 和 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 苦参碱、氧化苦参碱和肉豆蔻醚的浓度分别为 2, 6 和 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 100 μL , 每个浓度设 4 个复孔, 同时设空白对照和溶剂对照 (0.5% DMSO), 置 5% CO_2 , 37°C 培养箱中培养 24 h。每孔加入 100 μL MTT (终浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 置 5% CO_2 , 37°C 培养箱中温育 4 h 后弃去上清, 加入 100 μL 酸性异丙醇溶解。15 min 后, 在酶标仪上于 570 nm 测定吸光度值

($A_{570 \text{ nm}}$)。细胞存活抑制率 (%) = (对照组 $A_{570 \text{ nm}}$ - 实验组 $A_{570 \text{ nm}}$) / 对照组 $A_{570 \text{ nm}} \times 100\%$ 。实验数据用 Microcal Origin™ 计算程序处理, 药物对细胞的浓度-效应曲线用 Hill 数学模型进行拟合, 计算药物的 IC_{50} 值。

1.5 LDH 释放实验

按上述方法分组处理细胞, 置 5% CO_2 , 37°C 培养箱中培养 24 h。参考文献[10]所述方法, 收集各组上清液, 用 2% Triton X-100 裂解贴壁生长的细胞, 按 LDH 试剂盒说明书的方法分别测定细胞培养上清液及细胞裂解液中的 LDH 含量。LDH 释放率 (%) = 上清液 LDH 含量 / (上清液 LDH 含量 + 裂解液 LDH 含量) $\times 100\%$ 。

1.6 倒置显微镜下观察细胞形态

按上述方法分组处理细胞, 每隔 4 h 于倒置显微镜下观察细胞形态的改变, 24 h 后观察并照相。

1.7 Hoechst 33258 染色法观察凋亡细胞形态

按上述方法分组处理细胞, 培养 24 h 后洗涤细胞, 加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, 加入 Hoechst 33258 ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 避光染色 30 min, 洗涤细胞, 用激光共聚焦显微镜观察凋亡细胞形态的变化。激发光波长为 364 nm, 发射光滤片带通 (BP) 420~460 nm。

1.8 流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡率

按上述方法分组处理细胞 24 h, 参考文献[11]的方法, 制备成单细胞悬液, 70% 乙醇固定过夜, 洗涤细胞后加入 RNA 酶 ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 37°C 消化 30 min, 加入 PI ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 避光染色 30 min, 用流式细胞仪分析细胞周期和亚二倍体凋亡峰, 每个样品计数 10 000 个细胞。激发波长为 488 nm, 发射波长为 630 nm。

1.9 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析及 *t* 检验进行组间比较。

2 结果

2.1 五种中药成分对 MDCK II 细胞存活的影响

与正常对照组比较, 阳性对照组 HgCl_2 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 MDCK II 细胞作用 24 h, 细胞存活被明显抑制。AA I 对 MDCK II 细胞存活具有明显的抑制作用 (表 1), 并呈时间依赖性 ($r = 0.622$, $P < 0.05$) 和浓度依赖性 ($r = 0.850$, $P < 0.01$), AA I 作

用于 MDCK II 细胞 24, 48 和 72 h 时, IC_{50} 值分别为 (63.4 ± 6.6) , (44.8 ± 6.0) 和 $(37.3 \pm 4.6) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。AA II 对 MDCK II 细胞存活的抑制作用与 AA I 相似(表 2), 亦具有时间依赖性 ($r = 0.836$, $P < 0.05$) 和浓度依赖性 ($r = 0.946$, $P < 0.01$), AA II 作用于 MDCK II 细胞 24, 48 和 72 h 时, IC_{50} 值分别为 (125.7 ± 6.2) , (106.7 ± 20.4) 和 $(94.2 \pm 9.7) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。苦参碱、氧化苦参碱和肉豆蔻醚浓度高

达 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 与 MDCK II 细胞作用 24 h, 对细胞存活无明显影响(表 3)。

2.2 五种中药成分对 MDCK II 细胞膜的影响

由表 4 可见, 与 MDCK II 细胞作用 24 h, 与对照组相比, HgCl_2 组 LDH 的释放率明显增高, AA I ($5 \sim 300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 AA II ($25 \sim 300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) LDH 释放率亦明显增高, 表明 AA I 和 AA II 对 MDCK II 细胞膜有直接损伤作用, 但量效关系不明

Tab 1. Effect of aristolochic acid I (AAI) on Madin-Darby canine kidney type II (MDCK II) cell survival

Group	Cell survival ($A_{570 \text{ nm}}$)			Inhibition rate/%		
	24	48	72 (h)	24	48	72 (h)
Control	0.41 ± 0.02	0.67 ± 0.02	0.86 ± 0.06	0.00 ± 3.90	0.00 ± 2.79	0.00 ± 7.14
DMSO	0.38 ± 0.02	0.67 ± 0.03	0.82 ± 0.05	5.84 ± 3.87	0.45 ± 3.65	0.52 ± 5.50
HgCl_2	$0.33 \pm 0.02^{**}$	$0.51 \pm 0.03^{**}$	$0.63 \pm 0.01^{**}$	$19.80 \pm 4.90^{**}$	$21.20 \pm 5.04^{**}$	$23.82 \pm 1.41^{**}$
AA I 5	0.39 ± 0.01	0.69 ± 0.02	0.73 ± 0.02	4.80 ± 1.06	-4.29 ± 2.97	$11.41 \pm 2.98^{##}$
25	$0.31 \pm 0.01^{##}$	$0.54 \pm 0.05^{##}$	$0.54 \pm 0.15^{##}$	$22.76 \pm 3.29^{##}$	$19.86 \pm 7.75^{##}$	$33.89 \pm 17.80^{##}$
75	$0.20 \pm 0.01^{##}$	$0.21 \pm 0.05^{##}$	$0.09 \pm 0.01^{##}$	$51.66 \pm 2.07^{##}$	$69.17 \pm 8.06^{##}$	$76.86 \pm 24.08^{##}$
150	$0.13 \pm 0.02^{##}$	$0.09 \pm 0.04^{##}$	$0.05 \pm 0.01^{##}$	$67.22 \pm 4.22^{##}$	$86.56 \pm 6.22^{##}$	$93.66 \pm 0.12^{##}$
300	$0.12 \pm 0.01^{##}$	$0.07 \pm 0.01^{##}$	$0.05 \pm 0.01^{##}$	$71.34 \pm 2.28^{##}$	$89.10 \pm 0.98^{##}$	$93.48 \pm 0.40^{##}$

MDCK II cells were seeded at a density of 10^8 L^{-1} in 96-well plates. DMSO (0.5%), HgCl_2 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and AA I (5, 25, 75, 150 and $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) were added to MDCK II cells, respectively, 24 h after the plating, except control group (medium alone). The cell survival was measured after 24, 48 or 72 h of culture by MTT assay. The cell survival inhibition rate (%) = $(A_{570 \text{ nm}}$ of control group - $A_{570 \text{ nm}}$ of test group) / $A_{570 \text{ nm}}$ of control group $\times 100\%$. IC_{50} of AA I was (63.4 ± 6.6) , (44.8 ± 6.0) and $(37.3 \pm 4.6) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 24, 48 and 72 h, respectively. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$. $^{**}P < 0.01$, compared with control group; $^{##}P < 0.01$, compared with DMSO group.

Tab 2. Effect of aristolochic acid II (AA II) on MDCK II cell survival

Group	Cell survival ($A_{570 \text{ nm}}$)			Inhibition rate/%		
	24	48	27 (h)	24	48	72 (h)
Control	0.41 ± 0.02	0.67 ± 0.02	0.74 ± 0.02	0.00 ± 3.90	0.00 ± 2.79	0.00 ± 0.03
DMSO	0.38 ± 0.02	0.67 ± 0.03	0.73 ± 0.03	5.84 ± 3.87	0.45 ± 3.65	2.35 ± 0.04
HgCl_2	$0.33 \pm 0.02^{**}$	$0.51 \pm 0.03^{**}$	$0.59 \pm 0.06^{**}$	$19.80 \pm 4.90^{**}$	$21.20 \pm 5.04^{**}$	$20.67 \pm 0.09^{**}$
AA II 5	0.46 ± 0.02	0.69 ± 0.03	0.70 ± 0.03	-12.24 ± 4.14	-4.07 ± 5.14	6.03 ± 3.63
25	0.38 ± 0.03	0.66 ± 0.03	0.77 ± 0.07	7.26 ± 6.68	-1.72 ± 7.64	-4.74 ± 10.00
75	$0.30 \pm 0.01^{##}$	$0.41 \pm 0.06^{##}$	$0.37 \pm 0.07^{##}$	$25.22 \pm 1.57^{##}$	$38.93 \pm 8.93^{##}$	$49.89 \pm 9.67^{##}$
150	$0.22 \pm 0.01^{##}$	$0.35 \pm 0.04^{##}$	$0.35 \pm 0.08^{##}$	$47.05 \pm 2.90^{##}$	$41.09 \pm 14.82^{##}$	$55.77 \pm 9.20^{##}$
300	$0.13 \pm 0.02^{##}$	$0.10 \pm 0.03^{##}$	$0.09 \pm 0.07^{##}$	$68.20 \pm 4.70^{##}$	$86.14 \pm 4.05^{##}$	$90.13 \pm 8.58^{##}$

See Tab 1 for cell treatments. AA II 5, 25, 75, 150 and $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ were added to MDCK II cells, respectively. IC_{50} of AA II was (125.7 ± 6.2) , (106.7 ± 20.4) and $(94.2 \pm 9.7) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 24, 48 and 72 h, respectively. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$. $^{**}P < 0.01$, compared with control group; $^{##}P < 0.01$, compared with DMSO group.

Tab 3. Effect of matrine, oxymatrine and myristicin on MDCK II cell survival

Group		Cell survival ($A_{570\text{ nm}}$)	Inhibition rate/%
Control		0.58 ± 0.03	0.00 ± 5.41
HgCl ₂		0.47 ± 0.03**	19.71 ± 4.72**
Matrine	2	0.63 ± 0.01	-7.67 ± 1.88
	6	0.63 ± 0.04	-7.13 ± 7.07
	10	0.61 ± 0.03	-2.97 ± 5.71
Oxymatrine	2	0.59 ± 0.03	-2.37 ± 5.73
	6	0.58 ± 0.02	-0.65 ± 3.03
	10	0.58 ± 0.02	-0.86 ± 2.78
Myristicin	2	0.57 ± 0.04	0.95 ± 6.12
	6	0.65 ± 0.01	-12.84 ± 2.58
	10	0.63 ± 0.03	-7.91 ± 5.26

See Tab 1 for cell treatments. Matrine, oxymatrine and myristicin (2,6 and 10 mmol·L⁻¹) were added to MDCK II cells, respectively. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$. ** $P < 0.01$, compared with control group.

显。苦参碱、氧化苦参碱和肉豆蔻醚浓度高达 10 mmol·L⁻¹时,与 MDCK II 细胞作用 24 h,对 LDH 释放率无明显影响。

2.3 五种中药成分对细胞形态的影响

倒置显微镜下观察细胞形态,空白对照及 DMSO 对照组 MDCK II 细胞为卵圆形或短梭形,贴壁生长;阳性对照 HgCl₂ 组 MDCK II 细胞收缩变圆,部分破裂脱落;AA I (75 μmol·L⁻¹) 和 AA II (150 μmol·L⁻¹) 分别与 MDCK II 细胞作用 24 h 内亦可看到与阳性对照组相似的形态变化(图 1),且随着时间的增加越加明显,其表现为细胞轮廓逐渐清晰,细胞折光度增强,细胞逐渐变小变圆,失去突起,皱缩成球形,部分细胞破裂,随后细胞脱落或悬浮。浓度越高,细胞形态变化出现时间越早,且越明显。苦参碱、氧化苦参碱和肉豆蔻醚浓度高达 10 mmol·L⁻¹与 MDCK II 细胞作用 24 h,未见细胞形态发生明显变化。

2.4 五种中药成分对凋亡细胞形态的影响

Hoechst 33258 染色结果(图 2)表明,空白对照及 DMSO 对照组细胞核区染色质荧光分布均匀,核形状比较规则;阳性对照 HgCl₂ 组作用 24 h 细胞出现明显凋亡特征,可以看到凋亡小体;AA I (75 μmol·L⁻¹) 和 AA II (150 μmol·L⁻¹) 分别作用 24 h

Tab 4. Effect of AA I, AA II, matrine, oxymatrine and myristicin on lactate dehydrogenase(LDH) release in MDCK II cells

Group		LDH release rate/%
Control		6.24 ± 0.45
DMSO		7.05 ± 0.77
HgCl ₂		15.43 ± 2.33**
AA I	5	9.27 ± 0.24 ^{##}
	25	12.11 ± 1.98 ^{##}
	75	12.46 ± 0.85 ^{##}
	150	14.46 ± 0.37 ^{##}
	300	17.54 ± 1.75 ^{##}
	AA II	5
	25	8.84 ± 0.42 ^{##}
	75	12.65 ± 0.86 ^{##}
	150	14.99 ± 1.74 ^{##}
	300	15.30 ± 0.93 ^{##}
Matrine	2	6.58 ± 1.09
	6	6.83 ± 2.05
	10	6.35 ± 1.38
Oxymatrine	2	7.74 ± 2.67
	6	6.23 ± 0.27
	10	6.98 ± 1.35
Myristicin	2	6.20 ± 0.33
	6	6.54 ± 0.70
	10	7.44 ± 1.30

See Tab 1 for cell treatments. The drug concentrations were the same as that in Tab 1, Tab 2 or Tab 3. After 24 h of exposure, the release of LDH was measured by using LDH assay kit. LDH release rate(%) = LDH content in the medium/(LDH content in the medium + LDH content in cell lysis solution) × 100%. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$. ** $P < 0.01$, compared with control group; ^{##} $P < 0.01$, compared with DMSO group.

后细胞均出现明显凋亡特征,细胞核染色质发生了一系列形态学的改变:细胞核的染色质高度凝聚、边缘化,有些细胞核裂解为碎片,形成凋亡小体。苦参碱、氧化苦参碱和肉豆蔻醚浓度高达 10 mmol·L⁻¹,未见细胞核区发生明显变化。

2.5 五种中药成分对细胞周期和细胞凋亡的影响

与正常对照组相比,阳性对照 HgCl₂ 与 MDCK II 细胞作用 24 h 可出现 S 期阻滞,细胞凋亡率明显增

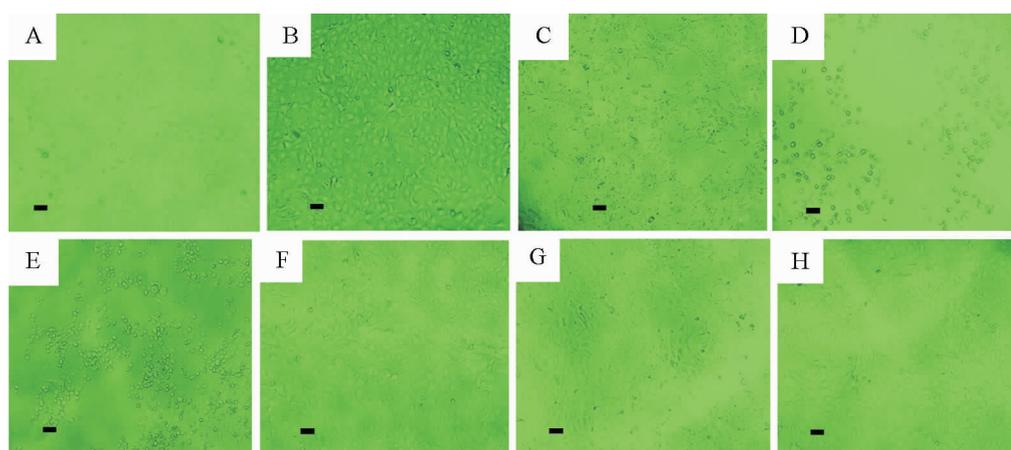


Fig 1. Effect of AA I, AA II, matrine, oxymatrine and myristicin on morphological changes of MDCK II cells ($\times 130$). See Tab 1 for cell treatments. After 24 h of exposure, MDCK II cell morphological changes were analyzed by contrast microscopy. A: control; B: 0.5% DMSO; C: HgCl_2 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; D: AA I $75 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; E: AA II $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; F: matrine $10 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; G: oxymatrine $10 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; H: myristicin $10 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Scale bar = $10 \mu\text{m}$.

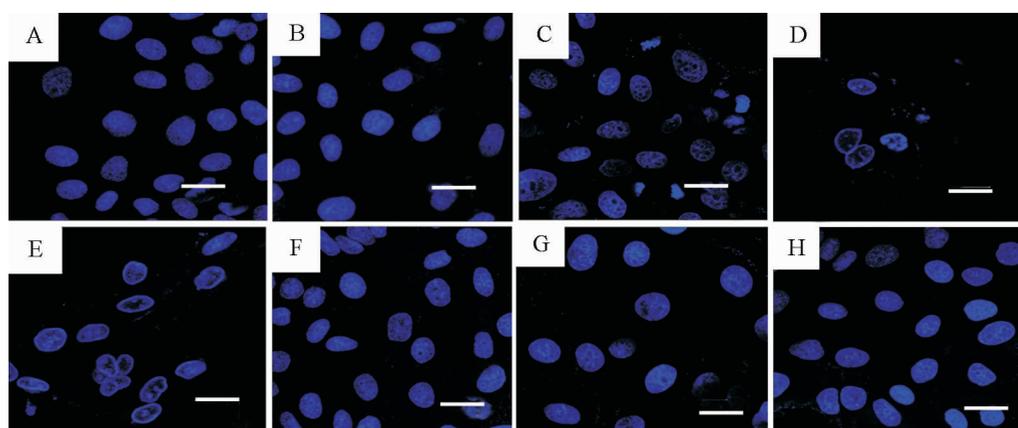


Fig 2. Effect of AA I, AA II, matrine, oxymatrine and myristicin on apoptosis of MDCK II cells. See Tab 1 for cell treatments. After 24 h of exposure, MDCK II cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min, then stained with Hoechst 33258 for 30 min, examined by confocal microscopy. A: control; B: 0.5% DMSO; C: HgCl_2 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; D: AA I $75 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; E: AA II $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; F: matrine $10 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; G: oxymatrine $10 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; H: myristicin $10 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Scale bar = $20 \mu\text{m}$.

加。AA I 在 $75 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时即出现 S 期阻滞, $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时即出现较明显的亚二倍体凋亡峰, 细胞凋亡率升高。AA II 在 $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时出现 S 期阻滞, $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时细胞凋亡率亦明显升高。苦参碱、氧化苦参碱和肉豆蔻醚浓度高达 $10 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 未见 S 期阻滞, 对细胞凋亡率无明显影响(表 5)。

3 讨论

含 AA 类中药是比较有代表性的肾毒性中药。已有研究表明 AA 是这类中药中的主要毒性成分。近年体内研究表明, AA 对家兔、大鼠、小鼠和人体

均有肾毒性作用^[12]; AA 和含 AA 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。Wistar 雌性成年大鼠给予 AA 10, 50 和 $100 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 有肾脏损害^[13], SD 大鼠灌胃 AA I $30 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 亦可见肾脏毒性反应^[14]。国内外已有不少关于 AA 对体外肾小管上皮细胞毒性研究的报道, 多集中在 AA 对人肾小管上皮细胞 HK-2、猪肾小管上皮细胞系 LLC-PK1 等的毒性研究, 尚未见其对 MDCK II 细胞的毒性研究。已有研究表明, AA I 和 AA II 是 AA 的主要成分, 也是其主要的毒性成分^[15], AA I 和 AA II 可引起 HK-2 和 LLC-PK1 细胞凋亡^[9,11], AA 具有“胞浆毒”特性, 可直接对肾小管上皮细胞

Tab 5. Effect of AA I, AA II, matrine, oxymatrine and myristicin on cell cycles and apoptosis of MDCKII cells

Group		G ₀ + G ₁ / %	G ₂ + M / %	S / %	Apoptosis rate / %
Control		75.46 ± 3.13	8.29 ± 0.79	16.26 ± 2.34	1.96 ± 0.65
DMSO		80.51 ± 2.82	5.20 ± 2.75	14.29 ± 2.24	2.97 ± 1.27
HgCl ₂		59.57 ± 5.36	12.74 ± 1.22	27.70 ± 4.94**	11.71 ± 1.47**
AA I	5	79.22 ± 6.31	5.11 ± 2.29	16.97 ± 8.92	6.62 ± 3.88
	25	74.34 ± 6.65	6.35 ± 4.03	19.31 ± 9.53	12.51 ± 2.01##
	75	70.45 ± 2.66	4.02 ± 0.20	25.53 ± 3.71###	28.98 ± 10.60###
	150	69.73 ± 6.19	8.56 ± 2.14	27.01 ± 2.79###	52.09 ± 25.22###
	300	68.86 ± 1.63	2.97 ± 1.99	27.65 ± 0.07###	54.38 ± 24.71###
AA II	5	74.65 ± 6.89	10.61 ± 2.39	14.79 ± 4.05	3.73 ± 2.50
	25	80.05 ± 2.77	3.94 ± 2.65	16.04 ± 1.03	8.65 ± 2.16##
	75	77.25 ± 5.68	2.63 ± 1.85	20.13 ± 6.59	29.69 ± 3.70##
	150	70.47 ± 7.17###	7.08 ± 4.78	22.45 ± 2.39###	35.49 ± 12.08##
	300	62.88 ± 5.71###	5.97 ± 0.44	31.16 ± 2.73###	53.83 ± 6.80##
Matrine	2	74.94 ± 3.83	12.58 ± 0.95	12.48 ± 4.06	1.31 ± 1.02
	6	74.17 ± 7.73	10.23 ± 2.64	15.60 ± 9.20	3.18 ± 0.70
	10	79.26 ± 11.48	11.00 ± 7.75	9.62 ± 3.56	3.47 ± 0.94
Oxymatrine	2	82.02 ± 11.48	6.67 ± 1.11	11.32 ± 0.92	1.52 ± 1.03
	6	82.79 ± 8.32	12.38 ± 5.68	4.83 ± 1.20	7.66 ± 4.80
	10	73.66 ± 10.74	13.01 ± 2.42	13.32 ± 8.36	2.30 ± 0.15
Myristicin	2	79.29 ± 5.34	14.59 ± 5.63	6.12 ± 1.87	6.31 ± 1.08
	6	81.69 ± 1.62	10.23 ± 1.24	8.09 ± 1.51	2.47 ± 0.34
	10	76.69 ± 7.75	13.67 ± 7.11	9.64 ± 1.37	4.75 ± 0.62

See Tab 1 for cell treatments. The drug concentrations were the same as that in Tab 1, Tab 2 or Tab 3. After 24 h of exposure, the cells were fixed with 70% ethanol, treated with RNase, stained with propidium iodide and detected by flow cytometry. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$.

** $P < 0.01$, compared with control group; ### $P < 0.01$, compared with DMSO group.

产生坏死作用^[16]。本研究结果表明, AA I 和 AA II 对 MDCK II 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 II 细胞膜, 且两者致膜损伤的作用相似。对 LDH 的释放率的影响量效关系不明显, 可能由于在高剂量时 ($75 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上) 细胞大量破裂脱落或悬浮, 造成细胞数量减少所致。Hoechst 33258 染色和流式细胞术分析结果相互验证, 表明 AA I 和 AA II 均可使细胞发生凋亡并且在 S 期阻滞, 提示 AA 类化合物所致的细胞

损伤与细胞凋亡有关。这与上述报道结果一致。

苦参碱和氧化苦参碱是苦豆子、苦参和广豆根等豆科槐属植物中生物碱的主要成分。大量的药理和临床研究发现, 苦参碱和氧化苦参碱具有抗病毒、抗炎和抗肿瘤等作用, 且不良反应较少^[17]。苦参碱对肠癌 HT-29 细胞和人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖具有抑制作用, 且能诱导 MG-63 细胞凋亡和影响细胞周期^[18-19]。中药肉豆蔻中的肉豆蔻醚具有明显的抗炎、镇痛和抗癌作用, 同时又具神经毒性, 有致幻作用^[20]。目前尚未见对苦参碱、氧化苦参碱和肉豆蔻醚进行肾毒性的研究报道。本研究结果表明,

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 II 细胞存活无明显影响,对 MDCK II 细胞膜未见损伤作用;流式细胞分析和 Hoechst 33258 染色结果表明,苦参碱、氧化苦参碱和肉豆蔻醚($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)对细胞周期和细胞凋亡率均无明显影响。

综合上述实验结果表明,MDCK II 细胞对有肾毒性的 AAI 和 AAII、及未见肾毒性报道的苦参碱、氧化苦参碱和肉豆蔻醚的反应不同,提示 MDCK II 细胞培养体系可用于中药成分体外肾毒性评价,在中药新药研发早期进行体外肾毒性快速筛选,及时发现和淘汰毒性大的化合物,为中药新药研发提供毒性预测信息。

4 参考文献:

- [1] Wang YC, Zhong LF. Progress in the mechanism of nephrotoxicity induced by Chinese herbs[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2006, **17**(5): 834-835.
- [2] Broadherd CL, Walker D, Skinner R, Simmons NL. Differential cytotoxicity of ifosfamide and its metabolites in renal epithelial cell cultures[J]. *Toxicol In Vitro*, 1998, **12**:209-217.
- [3] Ludwig T, Riethmuller C, Gekle M, Schwerdt G, Oberleithner H. Nephrotoxicity of platinum complexes is related to basolateral organic cation transport[J]. *Kidney Int*, 2004, **66**(1):196-202.
- [4] Jan CR, Wang JL, Chou KJ, Cheng JS, Lee KC, Tseng LL, et al. NPC-14686, a novel anti-inflammatory agent, increased intracellular Ca^{2+} concentrations in MDCK renal tubular cells[J]. *Int J Immunopharmacol*, 2000, **22**(11):915-921.
- [5] Yeh JH, Chung HM, Ho CM, Jan CR. Mercury-induced Ca^{2+} increase and cytotoxicity in renal tubular cells[J]. *Life Sci*, 2004, **74**(16):2075-2083.
- [6] Aleo MF, Morandini F, Bettoni F, Giuliani R, Rovetta F, Steimberg N, et al. Endogenous thiols and MRP transporters contribute to Hg^{2+} efflux in HgCl_2 -treated tubular MDCK cells[J]. *Toxicology*, 2005, **206**(1): 137-151.
- [7] Aleo MF, Morandini F, Bettoni F, Tanganelli S, Vezzo-la A, Giuliani R, et al. Antioxidant potential and gap junction-mediated intercellular communication as early biological markers of mercuric chloride toxicity in the MDCK cell line[J]. *Toxicol In Vitro*, 2002, **16**(4): 457-465.
- [8] Aleo MF, Morandini F, Bettoni F, Tanganelli S, Vezzo-la A, Giuliani R, et al. *In vitro* study of the nephrotoxic mechanism of mercuric chloride[J]. *Med Lav*, 2002, **93**(3):267-278.
- [9] Guo YC, Lin ZX, Li H, Luo WH. The toxic effects of three aristolochia compounds on HK-2 cell[J]. *Carcinog Teratog Mutag*(癌变·畸变·突变), 2006, **18**(2):88-92.
- [10] Li B, Li XM, Zhang CY, Wang X, Cai SQ. Injury in renal proximal tubular epithelial cells induced by aristololactam I[J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2004, **29**(1):78-83.
- [11] Gao RT, Zhen FL, Liu YX, Zheng DX, Li XM, Bo YH. Aristolochic acid I-induced apoptosis in LLC-PK1 cells[J]. *Chin J Nephrol*(中华肾脏病杂志), 1999, **15**(3):162-165.
- [12] Zeng MY, Li MM, Zhao XW. Toxic reaction of aristolochic acid components[J]. *Tradit Chin Drugs Res Clin Pharmacol*(中药新药与临床药理), 1995, **6**(2): 48-50.
- [13] Liang AH, Ding XS, Liu BY. Studies on the renal toxicity caused by aristolochic acids (AAs) and Chinese herbs containing AAs[J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2004, **28**(1):10-14.
- [14] Xu XY, Zhang LY, Jiang ZZ. Study on nephrotoxicity of aristolochic acid I in SD rat[J]. *Chin J Biochem Pharm*(中国生化药物杂志), 2006, **27**(6):336-339.
- [15] Qiao HX, Li LD, Wu LM. Molecular cellular toxicology of aristolochic acid and its advances[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*(中国药理学与毒理学杂志), 2006, **20**(6):515-520.
- [16] Tang GY, Tian XF, Zhen YP. Effect of aristolochic acid on human renal cells *in vitro*[J]. *Chin J Nephrol*(中华肾脏病杂志), 2002, **18**(4):226-269.
- [17] Zhang FL, Tang Y, Zhang JM. Advance in research into mechanism and pharmaceuticals of matrine and kurarinone[J]. *J Henan Coll Tradit Chin Med*(河南中医学院学报), 2004, **19**(3):84-86.
- [18] Peng YH, Hao YB, Shi YQ, Han S, Jia Y. Mechanism of matrine suppressing HT-29 cell line proliferation[J]. *Chin J Exp Surg*(中华实验外科杂志), 2005, **22**(11):1353-1354.
- [19] Zheng AX, Chen J, Tao HM. Proliferation inhibition and apoptosis induction by matrine in MG-63 cell *in vitro*[J]. *J Pract Oncol*(实用肿瘤杂志), 2005, **20**

(6):516-519.

[20] Li JF, Wu LJ, Jia TZ, Yuan ZM, Gao HY. Chemical constituents from *Myristica fragrans* Houtt[J]. *J Sheny-*

ang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2006, 23 (11):698-701.

Evaluation of nephrotoxicity induced by Chinese herbal ingredients with MDCK II cells *in vitro*

LIU Qing¹, WANG Qi^{1*}, YANG Xiu-Wei², ZHANG Bao-Xu¹

(1. Department of Toxicology, School of Public Health, 2. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: AIM To evaluate the nephrotoxicity induced by Chinese herbal ingredients with Madin Darby canine kidney type II (MDCK II) cells and explore the possibility of using MDCK II cells to early assess the nephrotoxicity of Chinese herbal ingredients *in vitro*. **METHODS** The cytotoxicities of aristolochic acid I (AA I), aristolochic acid II (AA II), matrine, oxymatrine and myristicin were investigated. The cell survival inhibition rate of MDCK II cells after treatment of these drugs were studied by MTT assay, and the morphological changes of MDCK II cells were examined with contrast microscopy. Cell membrane injury was observed by detecting lactate dehydrogenase (LDH) release rate. Cell cycle and apoptosis rate were determined by using flow cytometry. The morphological changes of apoptosis cells were examined with Hoechst 33258 staining. **RESULTS** MDCK II cell survival was inhibited after exposed to AA I and AA II, respectively. The IC₅₀ values of AA I for 24, 48 and 72 h were (63.4 ± 6.6), (44.8 ± 6.0) and (37.3 ± 4.6) μmol · L⁻¹, respectively. The IC₅₀ values of AA II for 24, 48 and 72 h were (125.7 ± 6.2), (106.7 ± 20.4) and (94.2 ±

9.7) μmol · L⁻¹, respectively. The LDH release rate of MDCK II cells significantly increased after treated with AA I or AA II for 24 h. MDCK II cells were contracted and rounded after treated with AA I (75 μmol · L⁻¹) or AA II (150 μmol · L⁻¹) for 24 h. The further research also indicated that AA I and AA II affected cell cycle and induced cell apoptosis. After treated with matrine, oxymatrine and myristicin (2-10 mmol · L⁻¹) for 24 h, all above the parameters of MDCK II cells had no obvious changes. **CONCLUSION** MDCK II cells have different responses to AA I and AA II with nephrotoxicity, and matrine, oxymatrine and myristicin without reports of nephrotoxicity. MDCK II cells may be useful for assessment of nephrotoxicity of Chinese herbal ingredients *in vitro*.

Key words: kidney; toxicity; MDCK II cells; drugs, Chinese herbal

Foundation item: The project supported by Beijing Science and Technology Foundation(Z0004105040311)

* Corresponding author.

(本文编辑 齐春会)