· 综 述 ·

马兜铃酸肾病发病机制的研究进展

苟 蓉 周 莉 刘 芳

马兜铃酸肾病 (aristolochic acid nephropathy, AAN) 是指服用含有马兜铃酸成分的中草药而导致的肾脏损害^[1]。1964 年吴松寒^[2]首次报道了木通致急性肾衰竭的事件,但并未引起医学界的广泛关注。直到 1993 年 Vanherweghem JL^[3]报道了比利时妇女因服用含有广防己的减肥丸导致肾功能衰竭的事件,马兜铃酸肾损害才得到广泛重视。近年的研究发现含马兜铃酸的植物也是巴尔干肾病的重要环境因素^[4,5]。虽然目前许多国家禁止使用含有马兜铃酸的中草药,但此类药物的不恰当使用仍然存在,特别是在崇尚中医中药的亚洲国家。因此,深入探讨马兜铃酸的肾毒性,防治马兜铃酸肾病,对合理应用我们的传统医学是非常重要的。

1 含马兜铃酸的中草药及马兜铃酸 马兜铃属植物广泛分布于热带和亚热带,据黄枝优等^[6]报道全世界有 200 余种,我国有 40 余种,常用的中药有马兜铃、青木香、天仙藤、广防己、关木通、寻骨风、朱砂莲等。常用中成药有龙胆泻肝丸、妇科分清丸、大黄清胃丸、冠心苏合丸等。马兜铃酸 (aristolochic acid, AA) 是一种硝基菲化合物,是 3,4-次甲二氧基-10-硝基-1-菲酸的衍生物。AA 在体内通过硝基还原反应被转化为结构更为稳定的马兜铃内酰胺 (aristololactam, AL)。AL 又可进一步被细胞色素 P450 和过氧化酶两个系统激活从而形成 DNA 加合物^[7]。AL 既是 AA 在体内的代谢产物,也是一些中草药中的独立成分。目前研究认为 AA 的主要毒性成分为 AA-I 和 AL-I^[8]。但有关 AA 的不同成分及代谢产物致 AAN 和泌尿系肿瘤的作用及其机制尚需进一步研究。

2 马兜铃酸肾病的发病机制 AA 引起肾脏损害的机制目前仍不十分清楚。近年来的初步研究认为马兜铃酸肾病发病机制可能涉及以下方面。

2.1 直接损伤及修复不良 AAN 患者尿中低分子量蛋白分泌增加,肾组织中中性肽链内切酶和 megalin 表达下降等现象提示 AA 及其代谢物对肾脏有直接损伤作用,其靶细胞主要是近端肾小管上皮细胞。可导致上皮细胞坏死、凋亡、转分化或者对蛋白重

吸收功能下降。戚新明等^[9]用 AA 刺激人肾小管上皮细胞结果表明,AA 可诱导线粒体膜通透性增强,使线粒体肿胀、破坏,释放出钙离子和细胞色素 C,从而导致肾小管上皮细胞损伤,说明线粒体通透性改变是细胞损伤的重要机制。Pozdzik A 等^[10]用小鼠的 AAN 模型研究发现 AA 的小管毒性使抗氧化酶活性减低及线粒体损伤,近端小管上皮细胞的损伤及细胞凋亡蛋白酶-3 (半胱天冬蛋白酶-3) 激活使近端小管上皮细胞凋亡。与抗生素造成的小管间质损伤不同,急性 AAN 患者的肾脏病理检查可见小管上皮细胞坏死、分解、基底膜裸露,但几乎未见小管上皮的再生和细胞浸润。提示 AA 及其代谢产物在直接损伤细胞的同时,还抑制了细胞的增殖修复能力,而 AA 抑制细胞增殖修复的机制可能与细胞周期停滞、生长因子表达下降等有关。Li Y 等^[11]用 AA-I 刺激猪肾近端小管上皮细胞系 (Lewis-lung cancer porcine kidney cells, LLC-PK1) 发现 AA-I 可致 DNA 损伤,并使细胞周期阻滞在 G₂/M 期。Yang L 等^[12]对 AAN 患者的肾活检病理研究表明,表皮生长因子表达明显下降。这些因素导致了肾小管上皮细胞修复不良。王会玲等^[13]认为肾小管上皮细胞增生修复受抑制可能是因为 AA 抑制了肾组织骨形成蛋白-7 (bonemorphogenetic protein-7, BMP-7) mRNA 表达水平。

2.2 肾小管上皮细胞转分化及成纤维细胞活性增加 Wang Y 等^[14]用 AA-I 刺激体外培养的鼠原代肾小管上皮细胞 (renal tubular epithelial cells, RTECs) 研究发现小剂量长期刺激时可使 RTECs 表达波形蛋白和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA), 而角蛋白表达减少。说明 AA-I 可诱导肾小管上皮细胞转分化成肌成纤维细胞。进一步研究发现 AA-I 可诱导 RTECs 表达转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)、Smad2 增加,而 Smad7 表达下降。且用特异性的 TGF- β_1 受体拮抗剂 (SB-431542) 可使 AA-I 诱导的 RTECs 对肌成纤维细胞的特异性标志的表达减少。这说明 TGF- β_1 /Smad7 信号途径参与了 AA-I 诱导的上皮细胞转分化过程。肌成纤维细胞除了来源于小管上皮细胞外,尚有研究证明也可直接来源于间质成纤维细胞。唐功耀等^[15]用 AA 刺激人肾间质成纤维细胞 (human renal interstitial fi-

作者单位:四川大学华西医院肾内科(成都 610041)

通讯作者:刘芳, Tel: 028-81812214, E-mail: liufangth@163.com

broblasts, hRIFs) 发现: AA 可使 hRIFs 表达 I 型胶原、TGF- β_1 、纤溶酶原激活物抑制剂-1、金属蛋白酶组织抑制剂-1 的表达增加, 说明 AA 可刺激肾间质成纤维细胞活化, 分泌细胞外基质。张聪等^[16] 用免疫组化方法在慢性马兜铃酸肾病 (chronic aristolochic acid nephropathy, CAAN) 大鼠模型中观察到部分肾小管上皮细胞可转分化为 α -SMA 阳性的肌成纤维细胞, 并通过肾小管基底膜裂孔迁移至肾间质, 分泌胶原 I 等细胞外基质, 证明了上皮细胞转分化在 CAAN 的发病中起着重要作用。Pozdzik A 等^[10] 也证明间质中积聚的波形蛋白及 α -SMA 阳性细胞可表达 TGF- β_1 , 提示管周成纤维细胞的定植增加和成纤维细胞活化, 转化成肌成纤维细胞, 而这些定植活化的成纤维细胞也是胶原沉积的主要来源。Yang L 等^[12] 在 AAN 患者病理活检标本中也发现 α -SMA 阳性细胞增加, TGF- β_1 、结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 的表达也明显增加, 而细胞外基质成分 col-III、col-IV、纤连蛋白等的表达也有增加, 这表明小管上皮细胞转分化和其导致的基质沉积的确是 AA 致肾间质纤维化的重要机制。

2.3 肾脏局部缺血缺氧 AA 可直接损伤肾血管内皮细胞导致肾间质微血管减少, 还能损伤肾小管上皮细胞使血管活性物质失衡, 从而造成肾间质局部的缺血缺氧。Sun D 等^[17] 在 AAN 小鼠模型中也观察到血管内皮细胞生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达减少, 管周毛细血管进行性丢失, 缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 表达上调。Wen YJ 等^[18] 也在研究 AA 致急性肾小管坏死时发现 AA 可导致 HIF-1 α 的表达, 内皮素-1 表达上调, VEGF 表达下调。这些都说明肾脏局部缺血缺氧参与了 AAN 的发病机制。

2.4 免疫炎症反应机制 CAAN 患者肾活检提示病变部位无明显炎性细胞浸润, 免疫病理检查也多为阴性, 故以往认为免疫炎症机制不是 AAN 的主要发病机制。但左巍等^[19] 观察到 AAN 大鼠模型早期存在炎性细胞浸润, 随着疾病的发展炎性细胞浸润数目明显增多, 到第 13 周最为明显, 而后逐渐减少, 持续至 24 周时出现寡细胞性肾间质纤维化表现。Pozdzik A 等^[20] 用大鼠 AAN 模型研究表明近端肾小管坏死区域有单核/巨噬细胞和 T 淋巴细胞的浸润。这些研究提示免疫炎症机制可能参与了 AAN 的发生发展。

2.5 AA 生物转化代谢酶的基因多态性 近年的一系列研究^[21-23] 发现许多酶参与了 AA 在体内的代谢和致病过程, 如肝微粒体酶类 (细胞色素 P450) 可介导 AA 的还原激活, 可将 AA-I 代谢成毒性较小的

其他产物; NADPH/细胞色素 P450 还原酶主要参与 AA 的生物转化; 两种胞质酶硝基还原酶和黄嘌呤氧化酶可促进 AA-I 激活形成 DNA 加合物; 最近还证实细胞周期素/周期激酶复合物、乙酰转移酶、磺基转移酶等也参与了 AA 致泌尿系肿瘤的发生过程。从以前的病例报道^[3] 我们可以看出, 在同样服用减肥药丸的比利时妇女中, 只有 5% 左右发生了 AAN, 其原因主要是体内 AA 生物转化代谢酶的活性作用不同。而这些酶的活性是由个体差异, AA 生物转化酶的基因多态性和环境因素决定的, 其中最重要的是酶的基因多态性。例如肝细胞色素 P450 可将 AA-I 代谢成毒性较小的其他产物, 若肝细胞色素 P450 活性降低, 那么机体对 AA 的解毒将会下降, 则在服用 AA 后更易发生毒性反应。Xiao Y 等^[21] 用肝特异性细胞色素 P450 基因敲除小鼠证明了细胞色素 P450 在 AA 解毒过程中的重要作用。因此, 对于 AA 生物转化酶基因多态性的研究可以帮我们预测个体对 AAN 的易感性; 而对于参与体内 AA 代谢、致病的酶的研究可以帮助我们进一步认识马兜铃酸肾病的发病机制。

2.6 DNA 加合物与泌尿道上皮肿瘤 在 AAN 动物模型和 AAN 患者的肾和其他器官组织中, 均发现有 AA-DNA 加合物, 且具有器官特异性, 以肾组织最多。这种加合物可在动物和人体内蓄积, 并在他们的整个生存期中持续存在。加合物的形成一方面造成细胞相关功能的异常, 另一方面可能导致了药物损伤的持续存在和进展, 而且是 AA 致泌尿系统肿瘤的重要机制。虽然大多数 AA 所致的泌尿道上皮肿瘤发生于终末期肾衰竭患者中, 但仍有病例在还没有显著肾功能异常的阶段就发生了泌尿道上皮肿瘤, 这提示 AA 的致癌性可能是独立于肾毒性的。目前认为致癌机制与 AA-DNA 加合物的形成有关, AA 可在一系列酶如微粒体酶类 (CYP1A1、d CYP1A2)、胞质酶 (硝基还原酶和黄嘌呤氧化酶) 和 NADPH (醌氧化还原酶) 等的合作用下合成 AA-DNA 加合物。而 AA-DNA 加合物可使 ras 基因发生 A-T 互换突变而活化, 还能使抑癌基因 p53 突变失去正常功能, 从而使细胞增殖增强、分化异常, 最终导致肿瘤的发生^[24]。

近年 AAN 的研究取得了许多进展。AA 对肾脏的损伤一旦发生即成进行性发展, 停用 AA 后肾脏损伤仍然继续加重, 且 AAN 较一般的慢性肾脏疾病进展迅速、贫血重、肿瘤发生率高, 目前的药物治疗方法疗效欠佳。故除了普及中草药的毒性作用的知识, 加强中草药监督管理、强调防重于治外, 仍需寻找治疗 AAN 的有效方法。

参 考 文 献

- [1] Debelle FD, Vanherweghem JL, Nortier JL. Aristolochic acid nephropathy: A worldwide problem[J]. *Kidney Int*, 2008,74(2):158-169.
- [2] 吴松寒. 木通所致急性肾功能衰竭 2 例报告[J]. *江苏中医*, 1964,10:14.
Wu SH. 2 cases report of acute renal failure induced by *Caulis Akebiae*[J]. *Jiangsu J Tradit Chin Med*, 1964,10:14.
- [3] Vanherweghem JL, Depierreux M, Tielemans C, et al. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs [J]. *Lancet*, 1993,341(8842):387-391.
- [4] Long DT, Voice TC. Role of exposure analysis in solving the mystery of Balkan endemic nephropathy[J]. *Croat Med J*, 2007,48:300-311.
- [5] Grollman AP, Jelakovic B. Role of environmental toxins in endemic (Balkan) nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007,18:2817-2823.
- [6] 黄枝优, 赵秀川. 马兜铃属植物的肾毒性[J]. *时珍国医国药*, 2003,14(4):248.
Huang ZY, Zhao XC. Nephrotoxicity of plants of aristolochic genus[J]. *Lishizhen Med Materia Medica Res*, 2003,14(4):248.
- [7] Arlt VM, Stiborova M, Schmeiser HH. Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review[J]. *Mutagenesis*, 2002,17:265-277.
- [8] 乔洪翔, 李连达, 吴理茂. 马兜铃酸细胞分子毒理学研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2006,20(6):515-520.
Qiao HX, Li LD, Wu LM. Molecular cellular toxicology of aristolochic acid and its advances[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2006,20(6):515-520.
- [9] Qi X, Cai Y, Gong L, et al. Role of mitochondrial permeability transition in human renal tubular epithelial cell death induced by aristolochic acid[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007,222:105-110.
- [10] Pozdzik A, Salmon IJ, Debelle FD, et al. Aristolochic acid induces proximal tubule apoptosis and epithelial to mesenchymal transformation[J]. *Kidney Int*, 2008,73:595-607.
- [11] Li Y, Liu Z, Guo X, et al. Aristolochic acid I-induced DNA damage and cell cycle arrest in renal tubular epithelial cells *in vitro*[J]. *Arch Toxicol*, 2006,80(8):524-532.
- [12] Yang L, Li X, Wang H. Possible mechanisms explaining the tendency towards interstitial fibrosis in aristolochic acid-induced acute tubular necrosis[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2007,22(2):445-456.
- [13] 王会玲, 张金元. 马兜铃酸致大鼠肾小管损伤及对肾组织骨形态发生蛋白 7mRNA 表达的影响[J]. *中西医结合学报*, 2008,6(5):502-507.
Wang HL, Zhang JY. Aristolochic acid induces renal tubular injury and inhibits expression of bone morphogenetic protein-7 mRNA in renal tissue of rats[J]. *J Chin Integr Med*, 2008,6(5):502-507.
- [14] Wang Y, Zhang Z, Shen H, et al. TGF- β /Smad7 signaling stimulates renal tubulointerstitial fibrosis induced by AAI[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2008,28(4):413-428.
- [15] 唐功耀, 田雪飞, 谌贻璞. 马兜铃酸对人肾细胞作用的实验研究[J]. *中华肾脏病杂志*, 2002,18(4):266-269.
Tang GY, Tian XF, Chen YP. Effect of aristolochic acid on human renal cells *in vitro* [J]. *Chin J Nephrol*, 2002,18(4):266-269.
- [16] 张聪, 董鸿瑞, 谌贻璞. 慢性马兜铃酸肾病大鼠肾小管上皮细胞转分化与肾间质纤维化的关系[J]. *中华肾脏病杂志*, 2006,22(1):49-50.
Zhang C, Dong HR, Chen YP. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation and renal interstitial fibrosis in rats with chronic aristolochic acid nephropathy[J]. *Chin J Nephrol*, 2006,22(1):49-50.
- [17] Sun D, Feng J, Dai C, et al. Role of peritubular capillary loss and hypoxia in progressive tubulointerstitial fibrosis in a rat model of aristolochic acid nephropathy [J]. *Am J Nephrol*, 2006,26(4):363-371.
- [18] Wen YJ, Qu L, Li XM. Ischemic injury underlies the pathogenesis of aristolochic acid-induced acute kidney injury [J]. *Translat Res*, 2008,152(1):38-46.
- [19] 左巍, 刘亚革, 王继红, 等. 大鼠马兜铃酸肾病模型中炎症细胞浸润的特点及意义[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005,21(6):757-759.
Zuo W, Liu YG, Wang JH, et al. Characterishics and significance of aristolochic acid nephropathy model on infiltration of inflammatong cells [J]. *Chin J Cellular Molecular Immunol*, 2005,21(6):757-759.
- [20] Pozdzik A, Salmon IJ, Husson CP, et al. Patterns of interstitial inflammation during the evolution of renal injury in experimental aristolochic acid nephropathy[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008,23(8):2480-2491.
- [21] Xiao Y, Ge M, Xue X, et al. Hepatic cytochrome P450s metabolize aristolochic acid and reduce its kidney toxicity [J]. *Kidney Int*, 2008,73(11):1231-1239.
- [22] Stiborova M, Frei E, Sopkova B, et al. Human cytosolic enzymes involved in the metabolic activation of carcinogenic aristolochic acid: evidence for reductive activation by human NAD(P)H:quinone oxidoreductase[J]. *Carcinogenesis*, 2003,24(10):1695-1703.
- [23] Stiborova M, Frei E, Hodek P, et al. Human hepatic and renal microsomes, cytochromes P450 1A1/2, NADPH:cytochrome P450 reductase and prostaglandin H synthase mediate the formation of aristolochic acid-DNA adducts found in patients with urothelial cancer[J]. *Int J Cancer*, 2005,113(2):189-197.
- [24] Lord GM, Hollstein M, Arlt VM, et al. DNA adducts and p53 mutations in a patient with aristolochic acid-associated nephropathy[J]. *Am J Kidney Dis*, 2004,43(4):e11-e17.

(收稿:2009-06-03 修回:2009-11-10)