

· 专题 ·

通体结香技术产沉香的提取物灌胃 KM 小鼠的急性毒性研究[△]

刘洋洋^{1,2}, 田树红³, 冯剑¹, 杨云^{1,2}, 魏建和^{1,2*}

(1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所海南分所(海南省南药资源保护与开发重点实验室, 国家中医药管理局沉香可持续利用重点研究室), 海南 海口 570311;

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所(中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 濒危药材繁育国家工程实验室), 北京 100193;

3. 海南省药物安全性评价研究中心, 海南 海口 571199)

[摘要] 目的: 考察 KM 小鼠灌胃给药接受过量通体结香技术产沉香的提取物后可能出现的急性毒性反应。方法: 采用“最大给药量法”进行试验灌胃给予小鼠通体结香技术产沉香的提取物, 观察记录小鼠的中毒症状及死亡情况, 并于 14 d 后剖检小鼠观察其主要脏器。结果: 以 $40\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量给药后, 小鼠均未产生明显的毒性症状, 其体重与阴性对照组小鼠体重比较无显著差异($P>0.05$), 且大体剖检生命脏器未见异常。结论: 通体结香技术产沉香的提取物对 KM 小鼠无明显毒性。可认为成人以临床常用剂量服用通体结香技术产沉香药材安全可行。

[关键词] 沉香, 提取物, 最大给药量, 急性毒性

Acute Toxicity Study of Extracts from Agarwood

LIU Yangyang^{1,2}, TIAN Shuhong³, FENG Jian¹, YANG Yun^{1,2}, WEI Jianhe^{1,2*}

(1. Hainan Provincial Key Laboratory of Resources Conservation and Development of Southern Medicine & Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Agarwood Sustainable Utilization, Hainan Branch of the Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Haikou 570311, China;

2. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education & National Engineering Laboratory for Breeding of Endangered Medicinal Materials, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

3. Research Center for Drug Evaluation of Hainan Province, Haikou 571199, China)

[Abstract] **Objective:** To study the acute toxicity of KM mice by gavage excess extracts of agarwood produced by Agar-Wit. **Methods:** The agarwood extracts were administered by intragastric administration (*ig*) to KM mice at the maximum daily dose, toxicity symptoms and mortality were observed and recorded. The main organs of mice, dissected after 14 days, were examined by the unaided eye. **Results:** The mice were all not observed obvious poisoned symptom and death with the acute toxicity test in $40\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ dose, and no obvious diversity ($P>0.05$) was found by comparing the negative control group in weight of the mice, also no abnormal condition for the pathologic examination of main organs. **Conclusion:** No apparent subchronic toxicity could be observed in mice after *ig* agarwood extracts. Agarwood produced by Agar-Wit oral dose commonly used in clinical treatment is safe.

[Keywords] Agarwood; extracts; maximum daily dose; acute toxicity

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.8.007

沉香是来自常绿乔木瑞香科 Thymelaeaceae 沉香属 *Aquilaria* Lam 植物含有树脂的木材。《中华人民共

和国药典》记载沉香药材具有行气止痛, 温中止呕, 纳气平喘之功效, 可用于治疗胸腹胀闷疼痛, 胃寒

[△] [基金项目] 海南省重大科技计划项目(ZDKJ2016004); 国家自然科学基金项目(8143055); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-2-003); 中组部万人计划(99950534)

* [通信作者] 魏建和, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 药用植物基因资源、分子育种及次生代谢产物调控研究; Tel: 010-57833016; E-mail: wjianh@263.net

呕吐呃逆,肾虚气逆喘急等症^[1]。《本草乘雅半偈》记载:“沉香,气味辛,微温,无毒”^[2]。

白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg. 是我国生产沉香药材的唯一正品植物来源,野生资源主要分布于海南岛。健康的白木香树不能产生沉香,只有受到外界伤害后才能在树体中积累树脂,形成沉香。魏建和等提出白木香防御反应诱导结香假说^[3]并发明沉香“通体结香技术”^[4],实现了沉香药材规模化种植生产。为充分了解通体结香技术产沉香药材的安全性,确保临床用药安全,本文对通体结香技术产沉香药材进行急性毒性研究。

1 材料

1.1 药材和试剂

沉香药材(样品批号 120927YF03)采自海南省海口市演丰沉香种植基地,为采用通体结香技术在白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg. 上所产的沉香,由中国医学科学院药用植物研究所魏建和研究员鉴定为白木香含有树脂的木材,且按照《中华人民共和国药典》2015年版进行全检符合规定^[5],凭证标本保存于中国医学科学院药用植物研究所海南分所沉香鉴定中心标本馆。

95%乙醇(分析纯,西陇化工股份有限公司),吐温 80(分析纯,天津市大茂化学试剂厂)。

1.2 动物

KM 小鼠,SPF 级,18.2~20.7 g,雌雄各半,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供(实验动物合格证号:No 43004700000035)。

1.3 供试品的制备

为最大限度提取沉香中的成分,本实验前期比较了不同浓度乙醇溶液对沉香提取物的提取率,发现 70%乙醇提取率较高,因此,选择 70%乙醇作为提取溶剂。

沉香提取物的制备:取 2 kg 沉香药材,粉碎,用 70%乙醇加热回流提取 2 次,每次 1 h,过滤、合并提取液,减压浓缩至无醇味,得沉香提取物 350 g,提取率为 17.5%。

吐温溶液的制备:取吐温 80 加水配制成体积分数为 1%的吐温 80 水溶液。

沉香提取物供试品的制备:称取 20 g 沉香提取物置于研钵中,加入 40 mL 1%吐温 80 水溶液,混匀,置于冰箱内(2~8℃)冷藏 30 min,研碎呈均匀

的糊状,待用。

2 方法与结果

取 60 只 KM 小鼠,随机分组,分为供试品组(给予沉香提取物供试品)、溶媒对照组(给予 1%吐温 80 水溶液)和空白对照组,每组 20 只,雌雄各半。以允许的最大剂量对小鼠灌胃给药,即单次给药量为 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,间隔 4 h 后重复给药 1 次。给药前禁食 12 h,第 2 次给药结束后喂食,不禁水。

给药时观察药物对小鼠的毒性反应情况、死亡数和死亡时间^[6]。结果,各实验组小鼠给药后均未产生明显的毒性反应症状;分别于给药前和给药后 1 d、7 d 和 14 d 称量各实验组小鼠的体重(见表 1)。结果表明:供试品组和溶媒对照组小鼠体重与阴性对照组动物体重比较无显著差异, $p > 0.05$ 。说明沉香提取物以 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (给药浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)为给药剂量对 KM 种小鼠进行灌胃给药急性毒性试验,不会抑制和减轻小鼠的体重增长;给药 14 d 后,颈椎脱臼处死小鼠,大体剖检,检查实验各组小鼠主要生命器官(心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肾上腺、胸腺、膀胱、睾丸、附睾、子宫、卵巢和肠道等)及给药局部均未见异常。

表 1 各实验组小鼠体重增长情况($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

组别	小鼠体重/g			
	给药前	给药后 1 d	给药后 7 d	给药后 14 d
供试品组	20.5 ± 0.42	21.6 ± 0.53	27.6 ± 1.10	32.2 ± 2.14
溶媒对照组	20.2 ± 0.43	21.3 ± 0.37	27.1 ± 1.18	31.3 ± 3.11
阴性对照组	20.5 ± 0.37	21.5 ± 0.42	27.2 ± 1.27	31.7 ± 2.87

注: $P > 0.05$

3 结论与讨论

急性毒性是指在 24 h 内一次或多次给予动物受试药物后,所产生的毒性反应,包括一般行为和外观改变、大体形态变化以及死亡效应,是预测药物安全性的重要手段。通过急性毒性实验可了解药物的毒性反应和毒性程度^[6-7]。

本研究以沉香提取物为受试药物,以最大给药量对 KM 小鼠进行灌胃给药,给药剂量为 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (24 h 内 2 次给药的累计剂量),给药浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,给药后对 KM 小鼠未产生明显的毒性反应,且对小鼠体重亦未产生明显影响。

(下转第 1096 页)

- na inhibits LPS-induced tumor necrosis factor- α production by attenuating P38 MAPK activation[J]. *Inter J Gre Pharmacy*, 2011, 5(1): 291-296.
- [6] 陈地灵, 吴伟, 林励, 等. 沉香茶提取物的体外抗氧化和体内降血脂作用评价[J]. *现代食品科技*, 2013, 29(6): 1198-1201.
- [7] 段宙位, 李维国, 窦志浩, 等. 沉香叶黄酮类化合物的提取及其抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2015, 36(6): 45-50.
- [8] Takemoto H, Ito M, Shiraki T, et al. Sedative effects of vapor inhalation of agarwood oil and spikenard extract and identification of their active components[J]. *J Nat Med*, 2008, 62(1): 41-46.
- [9] Liu Y, Chen H, Yang Y, et al. Whole-tree agarwood-inducing technique: an efficient novel technique for producing high-quality agarwood in cultivated *Aquilaria sinensis* trees[J]. *Molecules*, 2013, 18(3): 3086-3106.
- [10] Alam J, Mujahid M, Badruddeen, et al. Hepatoprotective potential of ethanolic extract of *Aquilaria agallocha* leaves against paracetamol induced hepatotoxicity in SD rats[J]. *J Trad & Comple Med*, 2017, 7(1): 9-13.
- [11] 王颖芳, 王宇亮. 中药治疗肝损伤作用机理的实验研究进展[J]. *中医学报*, 2003, 18(1): 33-34.
- [12] Hwang Y P, Choi J H, Jeong H G. Protective effect of the *Aralia continental* root extract against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice[J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(1): 75-81.
- [13] Klamt F, Dal Pizzol F, Conte DF MJ, et al. Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free Radic Biol Med*, 2001, 30(10): 1137-1144.
- [14] Deng X, Wu K, Wan J, et al. Aminotriazole attenuated carbon tetrachloride-induced oxidative liver injury in mice. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(9): 3073-3078.
- [15] Abdullah, Khan M A, Ahmad W, et al. Hepatoprotective effect of the solvent extracts of *Viola canescens* Wall. ex. Roxb. against CCl_4 induced toxicity through antioxidant and membrane stabilizing activity[J]. *Bmc Complementary & Alternative Med*, 2017, 17(1): 10.
- [16] Michiels C, Raes M, Toussaint O, et al. Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 1994, 7(3): 235-248.
- [17] Zhu W, Fung P C. The roles played by crucial free radicals like lipid free radicals, nitric oxide, and enzymes NOS and NADPH in CCl_4 -induced acute liver injury of mice[J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 29(9): 870-880.
- [18] 黄振青, 韦燕飞, 刘雪梅, 等. 穗花杉双黄酮对急性肝损伤大鼠炎症相关因子的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(11): 147-150.
- [19] Chen Q, Qi Z, Li Y, et al. Schisandra Lignan Extract Protects against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury in Mice by Inhibiting Oxidative Stress and Regulating the NF- κ B and JNK Signaling Pathways[J]. *Evidence-based complement and alter med: eCAM*, 2017, 2017: 5140297.
- [20] Turovsky E A, Turovskaya M V, Gaidin S G, et al. Cytokine IL-10, activators of PI3-kinase, agonists of α -2 adrenoreceptor and antioxidants prevent ischemia-induced cell death in rat hippocampal cultures[J]. *Arch Biochem & Biophys*, 2017, 615: 35-43.

(收稿日期 2017-05-30)

(上接第1090页)

KM小鼠灌胃 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的给药剂量换算为成人(60 kg)的口服剂量约为 $3.24 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1[7]}$, 以沉香药材生药量计算成人(60 kg)的口服剂量约为 $18.51 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 即成人(60 kg)一日剂量高达 1.11 kg 沉香药材。而《中华人民共和国药典》规定成人服用沉香药材的1日常用剂量为 $1 \sim 5 \text{ g}^{[1]}$ 。因此, 可认为成人以临床常用量服用通体结香技术产沉香药材安全可行。

致谢: 本实验由中国医学科学院药用植物研究所海南分所提供通体结香技术产沉香的提取物实验材料, 并委托海南省药物安全性评价研究中心在该中心 GLP 实验室进行实验, 在此对中心给予本研究提供帮助的所有老师一并致谢。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:

中国医药科技出版社, 2010: 172.

- [2] 卢之颐. 本草乘雅半偈[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 450.
- [3] 张争, 杨云, 魏建和, 等. 白木香结香机理研究进展及防御反应诱导结香假说[J]. *中草药*, 2010, 41(1): 19-21.
- [4] Liu Y Y, Chen H Q, Yang Y, et al. Whole-tree agarwood-inducing technique: An efficient novel technique for producing high-quality agarwood in cultivated *Aquilaria sinensis* trees[J]. *Molecules*, 2013, 18, 3086-3106.
- [5] 刘洋洋, 杨云, 魏建和, 等. 不同产地通体香沉香药材的质量分析[J]. *中国现代中药*, 2014, 16(3): 183-186.
- [6] 国家食品药品监督管理局. 中药、天然药物急性毒性研究技术指导原则[Z]. 2005.
- [7] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学(第4版)[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 71, 383.

(收稿日期 2017-05-30)