

山豆根致大鼠肝毒性研究

李峰杰, 姚广涛*, 金若敏, 宋哲平

(上海中医药大学药物安全评价研究中心, 上海 201203)

[摘要] 目的: 观察山豆根长期大剂量给药后对大鼠产生的肝毒性反应。方法: SD 大鼠, 随机分为正常组、 $12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 山豆根组、 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 山豆根组, 分别灌服蒸馏水、 $12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 山豆根水煎液($0.6 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 山豆根水煎液($1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 连续给药 26 d。观察给药期间的一般表现, 体重变化等。末次给药后, 用 25% 乌拉坦腹腔麻醉, 腹主动脉取血, 离心, 取血清, 全自动生化仪检测 ALT, AST, ALP, Tbil, TP, ALB, GLO 等肝功能指标; 摘取肝脏, 称质量, 计算脏器指数; 按电镜要求, 取肝脏组织, 固定, 透射电镜下观察超微结构。结果: 大鼠连续灌胃山豆根水煎液 10 d 后, 动物活动减少, 四肢无力, 粪便以及尿液增多; 26 d 后, 与正常组比较, ALT 值及肝脏脏器指数升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), TP, ALB 值降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 电镜显示, 山豆根组动物肝脏细胞核变形、有肿胀趋势, 核膜皱缩, 毛细胆管扩张, 滑面内质网略见扩张。结论: 大鼠连续灌胃山豆根后, 可对肝脏产生毒性, 且随着剂量增加, 毒性增强。

[关键词] 山豆根; 大鼠; 肝毒性

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0190-04

Hepatotoxicity of Rats Induced by Radix et Rhizoma Sophorae Tonkinensis

LI Feng-jie, YAO Guang-tao*, JIN Ruo-min, SONG Zhe-ping

(Center for Drug Safety Evaluation, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] Objective: To detect the hepatic toxicity after giving large dose of Radix et Rhizoma Sophorae Tonkinensis (RRST) to rats for a long time. **Method:** The rats were divided into 3 groups (control group, $12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ drug group, $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ drug group) and given the drug for 26 days. During the days, the rats' behavior and weights were observed. After giving the drug for the last time, the rats were anaesthetized by 25% Urethane and the rats' blood was extracted from aorta abdominalis, then liver function was detected by using the blood serum. The rats' livers were taken and weighed, after that, the viscera index was calculated. According to the demand of electron microscope, hepatic tissues were fixed and ultrastructures were detected. Biochemical indicators such as ALT, AST, ALP, Tbil, TP, GLO and ALB were detected by using automatic analyzer. **Result:** After giving RRST for 10 days, the activity of the rats in drug group decreased, what's more, the rats had general fatigue and the amount their excrement and urine increased. After giving drug for 26 days, compared with normal group, the ALT and viscera index increased in drug group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), the TP, ALB decreased in drug group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); Through the electron microscope, the results showed that in RRST group, the shape of nucleus changed, nucleus had the tendency of swelling, nuclear membranes shrunk, bile capillaries enlarged and smooth surfaced endoplasmic reticulum enlarged slightly. **Conclusion:** RRST can cause hepatic toxicity in rats by intragastric administration and the toxicity will increase if the dose of drug is added.

[收稿日期] 20100810(004)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2009CB522807); 国家“重大新药创制”科技重大专项项目(2009ZX0902-002)

[作者简介] 李峰杰, 在读硕士, 中药新药及其毒理研究, Tel: 021-51323053, E-mail: lfj1210@126.com

[通讯作者] * 姚广涛, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药新药及其安全性评价研究, Tel: 021-51322472, E-mail: ygt1969@yahoo.com.cn

[Key words] Radix et Rhizoma Sophorae Tonkinensis; rats; hepatic toxicity

山豆根为豆科植物越南槐 *Sophora tonkinensis* Cagnap. 的干燥根及根茎, 主产于广西、贵州, 多为野生, 其药性苦寒, 有毒, 归肺、胃经; 功效清热解毒, 消肿利咽^[1,2], 常用于咽喉肿痛、牙龈肿痛、湿热黄疸、湿热带下以及心律失常、肝炎、肝癌等症^[2]。曾有报道患者服用过量山豆根后, 有中毒症状出现。本课题组已有研究表明, 大剂量山豆根可引起肝脏急性损伤, 且有一定的量效关系^[3]。为了进一步明确山豆根的肝毒性特点, 本实验就大鼠连续灌服山豆根后对肝脏产生的毒性反应进行了研究。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠, 清洁级, 雌雄各半, 180 ~ 200 g 上海斯莱克实验动物有限责任公司, 合格证号 SCXK 2008-0016。动物饲养于清洁级饲养室, 实验期间自由饮水、摄食, 室温 20 ~ 25 ℃, 湿度 40% ~ 70%, 光照周期 12 h 明, 12 h 暗, 通风良好。

1.2 药物 山豆根药材由四川新荷花中药饮片有限公司提供, 产地广西, 批号 0904295。

取 1 kg 药材加 5 倍量水, 浸泡 1 h, 武火煮沸, 文火煎 30 min, 过滤药液, 药渣中加 3 倍量水, 武火煮沸, 文火煎 30 min, 过滤药液。合并 2 次滤液, 浓缩至 2 g·mL⁻¹, 置于 4 ℃ 中, 备用。临用前, 用蒸馏水分别配成所需浓度。

1.3 试剂 丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 试剂 (批号 J921); 天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 试剂 (批号 J921); 碱性磷酸酶 (ALP) 试剂 (批号 J916); 总胆红素 (Tbil) 试剂 (批号 KL102); 总蛋白 (TP) 试剂 (批号 L090963); 白蛋白 (ALB) 试剂 (批号 L090933), 均由日本世诺临床诊断品株式会社提供。

1.4 仪器 Hitachi Automatic Analyzer 7080 日立 7080 全自动生化分析仪 (日本日立贸易有限公司); Philips Tecnai-12 Biotwin 透射电子显微镜 (Philips); 2-16K 冷冻离心机 (sigma 公司) AR2130 电子天平 (奥豪斯国际贸易上海有限公司); Waters alliance e2695 高效液相色谱仪, 2998 光电二极管矩阵检测器; Empower 2 软件。

2 方法

2.1 药材及水煎液的质量控制 实验前, 参照 2010 年版《中国药典》山豆根含量测定方法对山豆根药材及山豆根水煎液中的苦参碱、氧化苦参碱进

行含量测定, 以便对山豆根药材及山豆根水煎液进行质量控制。

2.1.1 色谱条件 色谱柱 YMC-Pack NH₂ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 乙腈-异丙醇-3% 磷酸溶液 (80:5:15); 流速 1 mL·min⁻¹; 检测波长 210 nm, 柱温 30 ℃。

2.1.2 对照品溶液的制备 取苦参碱和氧化苦参碱对照品适量, 精密称定, 分别加流动相使溶解, 制成每 1 mL 含 20, 150 μg 的混合溶液, 即得。

2.1.3 山豆根药材检测样品的制备 取本品粉末 (过三号筛) 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入三氯甲烷-甲醇-浓氨试液 (40:10:1) 混合溶液 50 mL, 密塞, 称定质量, 用三氯甲烷-甲醇-浓氨试液 (40:10:1) 混合溶液补足减少的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 10 mL, 40 ℃ 减压回收溶剂至干, 残渣加甲醇适量使溶解, 并转移至 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 山豆根水煎液检测样品的制备 分别精密量取 3 个批次的水煎液各 1 mL, 置梨形瓶中, 减压回收至干, 精密加入三氯甲烷-甲醇-浓氨试液 (40:10:1) 混合溶液 50 mL, 密塞, 称定质量, 放置 30 min, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 再称定质量, 用三氯甲烷-甲醇-浓氨试液 (40:10:1) 混合溶液补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 25 mL, 40 ℃ 减压回收溶剂至干, 残渣加甲醇适量使溶解, 并转移至 25 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 取上述试液 1 mL 至 100 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.5 样品测定 分别精密吸取对照品与供试品检测样品各 5 μL 注入液相色谱仪测定, 见图 1 ~ 3。

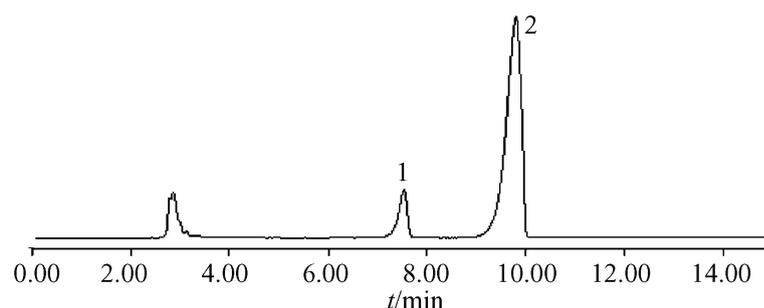


图 1 对照品 HPLC

1. 苦参碱; 2. 氧化苦参碱

2.2 山豆根致大鼠肝毒性实验 SD 大鼠 36 只, 雌雄各半, 随机分为 3 组, 分别为正常组、山豆根 12 g·kg⁻¹ 组 (0.6 g·mL⁻¹)、山豆根 20 g·kg⁻¹ 组 (1 g·

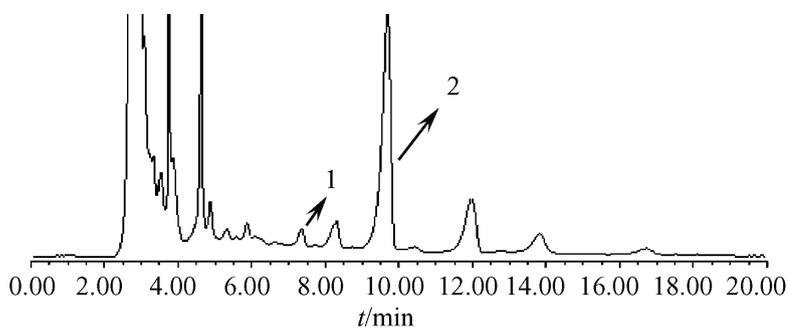


图 2 山豆根药材 HPLC
1. 苦参碱; 2. 氧化苦参碱

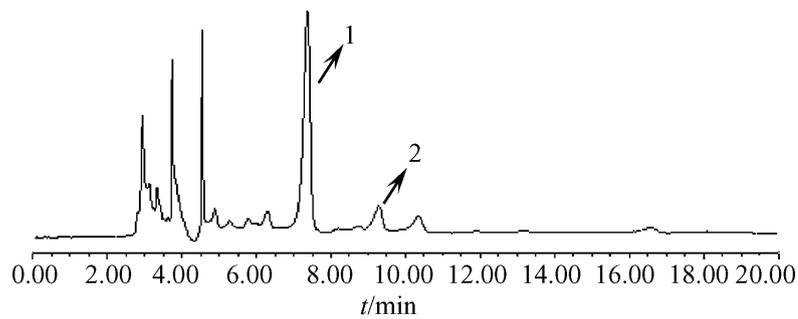


图 3 山豆根水煎液 HPLC
1. 苦参碱; 2. 氧化苦参碱

mL⁻¹), 每组 12 只。给药组及正常组按 20 mL·kg⁻¹ 灌胃山豆根水煎液及蒸馏水, 每天 1 次, 连续 26 d。期间观察动物的一般表现, 如活动度、毛色等; 每周称 1 次体重。末次给药后晚上禁食不禁水, 第 2 天, 用 25 乌拉坦腹腔麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 4

离心, 8 000 r·min⁻¹ 10 min, 取血清, 全自动生化分析仪测定 ALP, ALT, TP, AST, ALB, Tbil, GLO 等; 摘取肝脏, 称质量, 计算脏器指数; 取肝组织, 2.5% 戊二醛固定, 1% 锇酸固定 2 h, 丙酮乙醇逐级脱水, 环氧树脂包埋, 醋酸铀和柠檬铅染色, 超薄切片后, 透射电镜下观察肝脏超微结构变化。

2.3 统计学方法 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 16.0 软件进行统计处理, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间采用单因素方差法, 组间两两比较齐性时用 LSD 方法分析, 方差不齐时用 Dunnett 方法分析。

3 结果

3.1 给药后的一般状况 给予山豆根 10 d 左右, 山豆根组动物出现活动减少, 四肢无力, 粪便以及尿液增多等现象, 一直持续至 26 d。体重与正常组比较未出现差异。

3.2 对血清 ALP, ALT, TP, AST, ALB, Tbil, GLO 等的影响 给药 26 d 后, 与正常组比较, 山豆根 12, 20 g·kg⁻¹ 组大鼠 ALT 值升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), TP, ALB 值降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), ALP 值有升高趋势。结果见表 1。

表 1 不同剂量山豆根给药 26 d 对大鼠肝功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	ALT/IU/L	AST/IU/L	ALP/IU/L	TP/g·L ⁻¹	ALB/g·L ⁻¹	GLO/g·L ⁻¹	ALB/GLO
正常	12	47.25 ± 14.28	172.58 ± 66.22	476.17 ± 225.68	64.68 ± 12.92	32.16 ± 4.67	32.52 ± 8.34	1.57 ± 0.17
山豆根 12 g·kg ⁻¹	12	84.00 ± 15.31 ¹⁾	128.25 ± 20.09	627.08 ± 252.69	54.26 ± 5.95 ²⁾	28.78 ± 2.64 ¹⁾	25.48 ± 3.36 ²⁾	1.69 ± 0.15
山豆根 20 g·kg ⁻¹	9	92.67 ± 26.81 ²⁾	135.11 ± 14.47	691.00 ± 166.58	51.44 ± 7.71 ²⁾	27.51 ± 2.44 ²⁾	23.93 ± 5.40 ²⁾	1.72 ± 0.18 ¹⁾

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.3 对肝脏脏器指数的影响 给药 26 d 后, 山豆根 20, 12 g·kg⁻¹ 组大鼠肝脏脏器指数升高, 与正常组比较有统计学差异 ($P < 0.01$), 结果见表 2。

3.4 对肝脏微观病理形态的影响 (图 4) 正常组: 细胞核正常, 线粒体正常, 内质网略见扩张; 山豆根 12 g·kg⁻¹ 组: 细胞核变形, 核膜皱缩, 细胞核有肿胀趋势, 毛细胆管扩张, 滑面内质网略见扩张; 山豆根

表 2 不同剂量山豆根给药 26 d 对大鼠肝脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	肝脏指数 /g/g × 100
正常	12	3.03 ± 0.23
山豆根 12 g·kg ⁻¹	12	3.50 ± 0.28 ²⁾
山豆根 20 g·kg ⁻¹	9	4.23 ± 0.31 ²⁾

20 g·kg⁻¹ 组: 细胞核变形, 核膜皱缩, 少量线粒体变形, 内质网扩张, 可见细胞间连接。

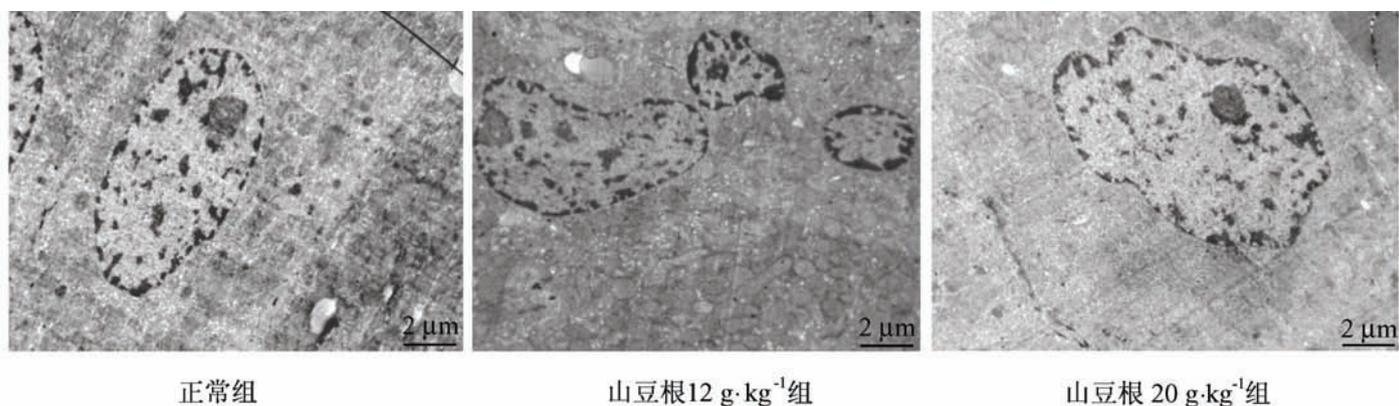


图 4 山豆根对肝脏微观病理形态的影响 (×4 200 倍)

(下转第 197 页)

mRNA 的表达而起治疗作用。

总之, 我们研究表明 CRS 存在鼻窦黏膜 IL-8, TNF- α mRNA 表达增高的现象, 鼻渊舒口服液可能通过调控鼻窦黏膜 IL-8, TNF- α mRNA 表达, 抑制单核细胞、淋巴细胞、中性粒细胞等炎细胞的浸润而改善鼻窦黏膜慢性炎症状态, 其相关调控机制将是我們进一步研究的方向。

[参考文献]

- [1] 林彬, 王挥戈. 窦口不完全堵塞加金黄色葡萄球菌诱导的兔慢性鼻-鼻窦炎模型 [J]. 汕头大学医学院学报, 2004, 17(3): 163.
- [2] Smith W B, Gamble J R, Clark Lewis L, et al. Interleukin induces neutrophil transendothelial migration [J]. J Immuno, 1991, 72(1): 65.
- [3] Baggiolini M, Moser B, Clark-Lewis I, et al. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines [J]. Chest, 1994, 105(3s): 95.
- [4] Suzuki H, Asada Y, Ikeda K, et al. Inhibitory effect of erythromycin on interleukin-8 secretion from exudative cells in the nasal discharge of patients with chronic

sinusitis [J]. Laryngoscope, 1999, 109: 407.

- [5] Robert M, Strieter J A. Cytokines in innate host defense in the lung [J]. J Clin Invest, 2002, 109(6): 699.
- [6] Medzhitov R, Janeway CA Jr. A human homologue of the drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity [J]. Nature, 1997, 388(6640): 394.
- [7] 夏敬文, 陈小东, 张静等. 莲花清瘟胶囊对慢性阻塞性肺病的治疗作用 [J]. 复旦学报: 医学版, 2008, 35(3): 441.
- [8] 张兵. 鼻炎宁颗粒对过敏性鼻炎大鼠 IL-4, IL-5 和 TNF- α 含量的影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(11): 193.
- [9] Lennard C M, Mann E A, Sun L L, et al. Interleukin-1, beta interleukin-5, interleukin-6, interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in chronic sinusitis: response to systemic corticosteroids [J]. Am J Rhinol, 2000, 14(6): 367.
- [10] 李延忠, 王岩, 王欣, 等. 慢性鼻窦炎患者上颌窦黏膜细胞因子的表达 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2002, 40(8): 362.

[责任编辑 邹晓翠]

(上接第 192 页)

4 讨论

古代本草认为山豆根无毒, 其有毒的记载始见《中国药典》1986 年版, 近代研究认为山豆根生药按毒性分级属有毒。临床曾报道, 山豆根的不良反应该以胃肠道反应为主, 以神经毒性反应损害为最。徐峰^[4]报道 5 例服用山豆根 10 g 后, 在 15 min ~ 1 h, 逐渐出现头晕头痛, 视物不清, 腹痛腹泻, 剧烈呕吐, 大汗淋漓, 胸闷心悸, 肢体震颤, 步态不稳, 甚则见有肢体麻痹等症状。盛云华等^[3]用小鼠口服山豆根水煎液, LD₅₀ 为 16.39 g·kg⁻¹, 小鼠一次性口服大剂量山豆根水煎液可造成急性肝损伤, 并显示一定的毒性时-效、量-效关系。山豆根可以增加肝脏脏器指数, 并可以引起肝功能酶学改变^[5]。

本实验的结果显示, 给予大鼠不同剂量山豆根 (20, 12 g·kg⁻¹) 10 d 后, 山豆根组动物出现活动减少, 四肢无力, 粪便以及尿液增多等现象; 26 d 后, 大鼠 ALT 值、肝脏脏器指数显著升高 (P < 0.01 或 P < 0.05), TP, ALB 值降低 (P < 0.01 或 P < 0.05), ALP 值有升高趋势; 电镜显示, 正常组细胞核正常, 线粒体正常, 内质网略见扩张; 12 g·kg⁻¹ 组细胞核有变

形, 核膜有皱缩, 细胞核有肿胀趋势, 毛细胆管扩张, 滑面内质网略见扩张; 20 g·kg⁻¹ 组细胞核变形, 核膜有皱缩, 少量线粒体有变形, 内质网扩张, 可以看到细胞间连接。

本研究的结果表明, 大鼠长期灌服 12, 20 g·kg⁻¹ 山豆根后即可产生明显的肝脏毒性, 与相关报道相符, 因此, 临床应用时应当引起注意。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部 [S]. 2005: 19.
- [2] 李家实. 中药鉴定学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998. 111.
- [3] 盛云华, 李峰杰, 金若敏. 山豆根致小鼠肝毒性及其病理形态学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 144.
- [4] 徐峰. 山豆根中毒 5 例 [J]. 广东医药杂志, 1999, 20(11): 900.
- [5] 向丽华, 陈燕萍, 张智, 等. 24 味有毒中药长期毒性实验对大鼠脏器指数的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(1): 35.

[责任编辑 邹晓翠]