

· 监管技术 ·

鸭嘴花碱经口单次给药安全性评价研究

陈桂芳¹, 高娟², 谭伟², 张祎^{3,4}, 孙赞^{3,4}, 秦定梅^{2,3,4*} (1. 云南医药健康职业学院, 昆明 650032; 2. 云南中医药大学中药学院, 昆明 650500; 3. 云南省民族特色养生理理论与健康产品工程实验室, 昆明 650500; 4. 省部共建生物资源保护与利用国家重点实验室, 昆明 650500)

摘要 目的: 通过研究鸭嘴花碱急性毒性, 评价鸭嘴花碱的安全性。方法: 将120只昆明种小鼠, 雌雄各半, 随机均等分为6组, 每组20只。按40 mL·kg⁻¹小鼠灌胃体积给予相应剂量的药物, 密切观察4 h, 记录小鼠毒性反应与死亡率。连续观察14天, 记录小鼠一般状态, 解剖观察脏器并计算脏器指数, 对存活小鼠肝脏、肾脏进行HE染色和生化指标检测。结果: 小鼠对鸭嘴花碱最大耐受量 (MTD) 为153.6 mg·kg⁻¹。观察14天后, 与空白组比较, 小鼠一般状态、脏器指数无明显变化; 病理结果显示无肝肾毒性; 血浆中ALT、Cre无显著变化, AST、BUN含量有下降趋势。结论: 小鼠对鸭嘴花碱的MTD为153.6 mg·kg⁻¹, 该剂量下对小鼠安全性高。

关键词: 鸭嘴花碱; 单次给药; 急性毒性; 安全性; 最大耐受量

中图分类号: R97 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)08-0919-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.08.009

Study on Safety Evaluation of Single Oral Administration of Vasicine

Chen Guifang¹, Gao Juan², Tan Wei², Zhang Yi^{3,4}, Sun Yun^{3,4}, Qin Dingmei^{2,3,4*} (1. Yunnan Medical Health Vocational College, Kunming 650032, China; 2. College of Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 3. Yunnan Province Engineering Laboratory for National Healthcare Theories and Products, Kunming 650500, China; 4. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resource in Yunnan, Kunming 650500, China)

Abstract Objective: To evaluate the safety of vasicine by studying its acute toxicity. **Methods:** A total of 120 Kunming mice were randomly divided into 6 groups with 20 mice in each group. The corresponding dose of the drug was administered at 40 mL·kg⁻¹ mouse intragastric volume. The toxic reaction and mortality of mice were observed closely for 4 h. The mice were observed continuously for 14 days and their general state was recorded. The organs were dissected and the organ index was calculated. HE staining and biochemical indicators on the livers and kidneys of surviving mice were detected. **Results:** The maximum tolerated dose (MTD) of vasicine in mice was 153.6 mg·kg⁻¹. After 14 days of observation, compared with blank group, the general state and organ index of mice had no significant change. Pathological results showed no hepatorenal toxicity. There were no significant changes in ALT and Cre in plasma, while the contents of AST and BUN decreased. **Conclusion:** The

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号 81760741); 云南生物资源保护与利用国家重点实验室开放课题 (编号 2021KF004); 云南医药健康职业学院中药学骨干专业建设 (编号 2022J1101)

作者简介: 陈桂芳 Tel: 13529032124; E-mail: 1920576985@qq.com

通信作者: 秦定梅 Tel: 13987152884; E-mail: 13588307@qq.com

MTD of mice was $153.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, which was safe for mice.

Keywords: vasicine; dosage; acute toxicity experiment; safety; maximum tolerable dose

鸭嘴花 (*Adhatoda vasica* Nees.) 是爵床科鸭嘴花属 (*Acanthaceae adhatoda* mill) 植物, 为云南省西双版纳傣族自治州等地著名的傣药, 傣药名为莫哈蒿, 资源丰富, 且分布广泛。药用部位有枝、叶和枝干, 其味微苦、气辛、性平; 归肝、脾经, 主要化学成分为生物碱、黄酮类等^[1-2]。鸭嘴花碱 (Vasicine) 是吡咯并[2,1-b]喹啉类生物碱, 可从植物鸭嘴花中分离得到, 是鸭嘴花主要活性成分之一^[3]。鸭嘴花碱具有多种生物活性, 现代药理研究表明, 鸭嘴花碱可作用于中枢神经系统、心血管系统、呼吸系统、生殖系统, 具有镇咳、抗糖尿病、抗菌、抗炎、抗氧化、肝脏保护等药理作用^[4-5], 具有广泛的应用价值, 但大剂量使用会引起毒性反应。经口单次给药毒性试验是毒理学研究的重要环节, 能够初步评价药物的安全性。现有鸭嘴花碱安全性评价研究较少, 本文拟通过最大耐受量 (Maximum Tolerated Dose, MTD) 法, 观察鸭嘴花碱对小鼠死亡情况、脏器变化、组织病理学、血液生化指标影响, 初步评价其安全性, 为鸭嘴花碱的研究提供理论依据。

1 实验材料

1.1 实验动物及饲养条件

SPF级昆明种小鼠, 雌雄各半, 体质量18~22 g, 6周龄, 实验动物购买于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物使用许可证编号[SYXK (滇) K2011-0011]。饲养在无特定病原体、空气流动、温度 (23 ± 2) °C、湿度 (55 ± 5) %、光暗每12 h为一个循环、小鼠自由获取食物和水的洁净动物室内, 适应性饲养3天。

1.2 受试药物及配制方法

受试药物: 鸭嘴花碱 (HPLC $\geq 98\%$), 由云南中医药大学天然产物活性与功能重点实验室提供。

提取分离: 取鸭嘴花干燥茎叶600 g粉碎为粗粉, 室温下用90%乙醇回流提取3次, 每次1.5 h, 合并3次滤液, 减压回收溶剂得浸膏89 g。用乙酸乙酯萃取得23 g浸膏。将上述浸膏进行硅胶柱层析, 以氯仿-甲醇溶剂系统 (1:0~0:1) 梯度洗脱, 各接收流份经TLC对比检查, 放弃部分斑

点不清或交叉严重的流份, 其余的根据TLC比较结果合并得到3个流份 (Fr. A1~A3)。流份Fr. A1利用氧化铝柱色谱分离, 以石油醚-丙酮溶剂系统 (1:0~4:1) 梯度洗脱, 进行反复柱层析, 结合重结晶方法分离纯化得到Fr. A1单体化合物2.2 g。其结构经¹H NMR和¹³C NMR表征, 与文献^[6]报道基本一致, 该化合物鉴定为鸭嘴花碱, 该药物经HPLC检测, 纯度 $\geq 98\%$ 。

溶媒 (0.5% CMC-Na溶液): 称取2 g CMC-Na, 溶于400 mL蒸馏水中, 搅拌使其完全溶解。

受试药物配制: 取提纯化合物鸭嘴花碱1200 mg, 用0.5% CMC-Na溶液充分分散并定容至160 mL; 以 $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 鸭嘴花碱混悬液作为母液, 按照0.8倍比稀释, 分别配制成不同药物浓度的混悬液; 每个浓度等体积分装成2份, 置于-20 °C冰箱中保存。

试剂: 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) (批号50116, 天津市光复精细化工研究所); AST谷草转氨酶试剂盒 (批号20200718)、ALT谷丙转氨酶试剂盒 (批号20200716)、Cre肌酐试剂盒 (批号20200908)、BUN尿素氮试剂盒 (批号20200711), 购于南京建成生物工程研究所; 一次性使用采血针 (批号20200817, 山东奥康特医疗器械有限公司); 一次性使用真空采血管 (EDTA-K2) (批号200503, 石家庄康卫仕医疗器械有限公司)。

1.3 实验设备

旋转蒸发器 (型号OSB-2100, 上海爱朗仪器有限公司); 超声清洗机 (型号SK3300LH, 上海科导超声仪器有限公司); 多功能酶标仪 (型号Spark 10M, Tecan Austria GmbH); -80 °C超低温冰箱 (型号Forma 902, Thermo Forma公司); 低温高速离心机 (型号5810R, Eppendorf公司); 电子分析天平 (型号AR224CN, 奥豪斯仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 分组、剂量选择及MTD测定

分组: 健康昆明种小鼠120只, 雌雄各半, 试验前小鼠禁食不禁水12 h, 随机分为5组给药组 (A~E) 和1组空白组 (F), 每组20只, 分框喂养

并标记。

剂量选择：文献^[7]报道小鼠口服鸭嘴花碱的半数致死量(LD₅₀值)为290 mg·kg⁻¹，本研究选用最大给药剂量为300 mg·kg⁻¹，按照1:0.8的组间比稀释，设定单次给药剂量分别为300、240、192、153.6、122.88 mg·kg⁻¹。以40 mL·kg⁻¹体积标准灌胃给药，各组分别一次性经口灌胃给予小鼠鸭嘴花碱混悬液，1次/天；空白组灌胃给予等体积0.5% CMC-Na溶液，1次/天，连续观察给药后0.5、1、2、4 h内小鼠有无毒性反应及死亡情况，若有中毒死亡小鼠需及时解剖观察^[8-9]。存活小鼠常规饲养至第14天，每天观察小鼠外观、行为活动状态、排泄情况、中毒症状、严重程度、是否可逆及恢复时间、死亡时间、死亡小鼠主要脏器外观等，根据小鼠死亡率找出小鼠对鸭嘴花碱的MTD。

2.2 检测指标

2.2.1 小鼠摄食量和体质量变化记录

实验观察期间，称量空白组和MTD组小鼠摄食量，2次/周，计算每只小鼠平均摄食量；每间隔1天记录1次小鼠体质量，3次/周。

2.2.2 小鼠血液生化指标检测

实验结束后，取适当浓度的戊巴比妥钠麻醉小鼠，采用腹腔主动脉取血。采血管室温静置30 min后，3000 r·min⁻¹，离心15 min，吸取上层血浆。严格按照试剂盒说明书，检测小鼠血液生化指标谷丙转氨酶(Alanine Transaminase, ALT)、谷草转氨酶(Aspartate Transaminase, AST)、尿素氮(Blood Urea Nitrogen, BUN)、肌酐(Creatinine, Cre)水平^[9]。

2.2.3 解剖观察、计算脏器指数及病理分析

动物死亡后，解剖并肉眼观察小鼠心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、胸腺、卵巢、子宫、精囊、前列腺、睾丸、胃肠等脏器是否有充血或水肿等异常情况以及明显病变，剖取肝、肾、胸腺、脾脏，称量记录脏器湿重并计算脏器指数^[10]。脏器指数(mg·g⁻¹)=脏器湿重(mg)/体质量(g)。取健康小鼠肝脏和肾脏组织用4%多聚甲醛固定，石蜡包埋、切片、苏木精-伊红常规染色、脱水、封片，于显微镜下观察，进行组织病理学分析。

2.3 统计学分析

采用GraphPad Prism 8.0.2软件对所得数据进行统计分析，数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示，2组间比较用 t 检验分析， $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 小鼠死亡率和MTD

观察小鼠给药后4 h、12 h、14天中的死亡情况(见表1)。F组无小鼠死亡和不良反应；A~C组均有小鼠死亡，发生在给药当天4 h内，小鼠一般毒性症状：呼吸急促、喘息、困倦、僵住、俯卧、震颤、强直性抽搐、角弓反张、角膜眼睑闭合、散瞳、眼角分泌物、竖毛、尿失禁、体温下降等，给药后观察14天内，无动物死亡；D组和E组均无小鼠死亡，出现一定程度的倦怠、俯卧不动、皮肤发红等症状，2 h后症状基本消失，且给药10 min内小鼠开始进食，给药后14天，无动物死亡。说明鸭嘴花碱给药剂量在153.6 mg·kg⁻¹以下时，小鼠未出现死亡，推断该剂量为小鼠对药物的MTD。

表1 各组小鼠死亡情况

组别	药物浓度/(mg·kg ⁻¹)	动物总数/只	死亡数/只	死亡率/%	死亡小鼠/只	
					0~0.5 h	0.5~1 h
A组	300	20	10	50	7	3
B组	240	20	7	35	3	4
C组	192	20	6	30	6	0
D组	153.6	20	0	0	0	0
E组	122.8	20	0	0	0	0
F组	0	20	0	0	0	0

3.2 死亡小鼠剖检结果

实验期间,对中毒死亡小鼠及时解剖,肉眼观察可见胃壁完整、心肺正常、肾脏颜色正常、肝脏呈暗红色,未见异常情况。实验结束后对正常存活小鼠进行解剖,观察心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、胸腺、卵巢、子宫、精囊、前列腺、睾丸、胃肠颜色、大小、形态均正常,未见明显水肿、充血、萎缩或退化等病变及异常情况。

3.3 小鼠一般情况观察

观察期间,空白组和MTD组小鼠一般情况良好,期间毛色光泽、饮食、饮水及行为活动均正

常,排泄正常且无腹泻情况出现,均未出现明显毒性、不良反应及死亡情况。

3.4 鸭嘴花碱MTD对小鼠摄食量和体质量变化的影响

空白组小鼠摄食正常,体质量增长正常,无任何不良反应;与空白组相比,鸭嘴花碱MTD组平均每只小鼠摄食量和体质量增长无显著变化,未出现体质量下降情况,均在正常范围,结果见图1。表明鸭嘴花碱浓度为 $153.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时对小鼠摄食量和体质量增长无明显影响。

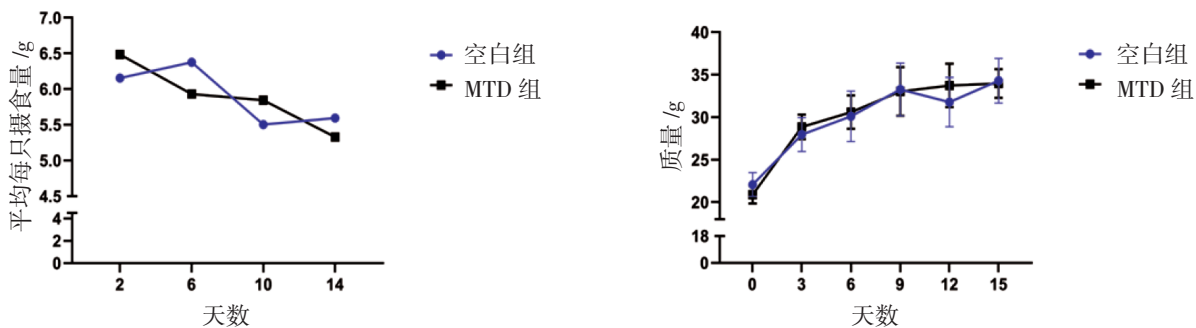


图1 鸭嘴花碱 MTD 对小鼠摄食量和体质量的影响 ($n=20, \bar{x} \pm s$)

3.5 鸭嘴花碱MTD对小鼠脏器指数的影响

与空白组相比较,MTD组肝脏、肾脏、脾脏、胸腺脏器指数无显著性差异 ($P>0.05$),结

果见图2。表明鸭嘴花碱MTD对小鼠脏器无显著影响。

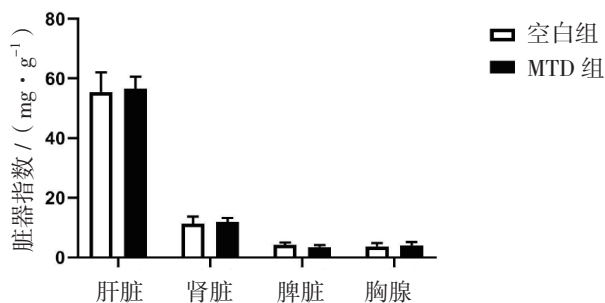


图2 鸭嘴花碱 MTD 对小鼠脏器指数的影响

3.6 小鼠一般病理学观察

空白组小鼠肝脏病理切片结果中显示,肝细胞轮廓清晰,核圆形,细胞膜完整,每个肝细胞有1~2个核,有核仁,静脉周围的肝细胞呈放射状排列,可见有淋巴细胞分布。与空白组相比,MTD组

小鼠肝脏病理切片结果中,未见炎性细胞大量浸润,肝细胞变性、坏死、脂肪空泡等情况,结果见图3。说明鸭嘴花碱MTD未出现肝损伤现象,无肝脏毒性。

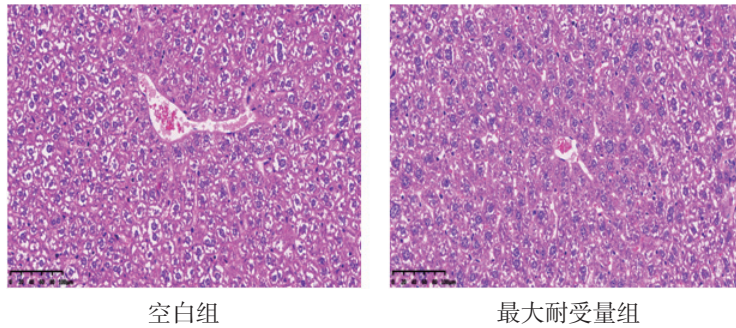


图3 小鼠肝脏组织 HE 染色 (100 ×)

空白组小鼠肾脏病理结果显示, 肾细胞排列规整, 细胞间隙小, 肾脏结构正常; 肾小球及肾小管结构清晰, 肾小管形态规则, 肾小球呈圆形或卵圆形, 间隙充盈且均匀; 与空白组相比, MTD组小

鼠肾脏病理切片结果中, 未出现肾小球损害, 肾小管或肾间质损伤, 细胞变性、坏死、水肿, 细胞外基质增生、炎性细胞浸润的情况, 结果见图4。说明鸭嘴花碱MTD未出现肾脏损伤现象, 无肾毒性。

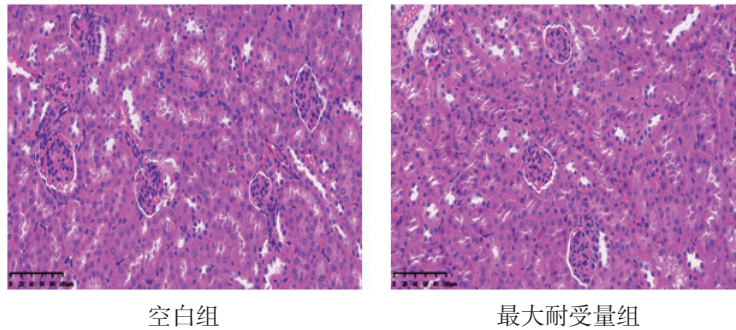
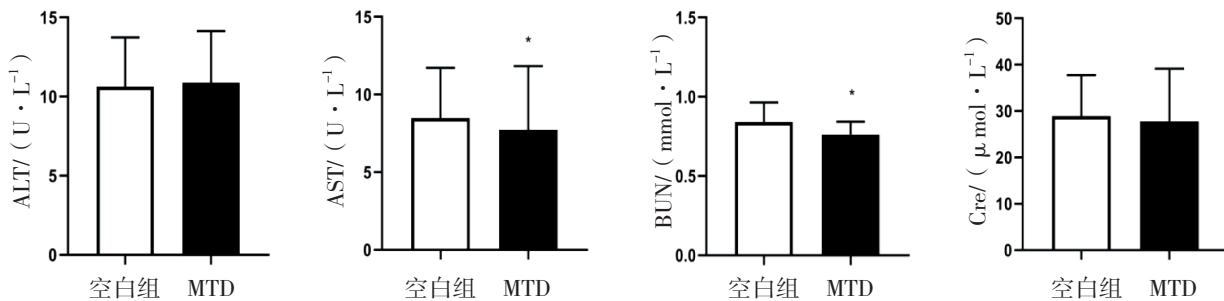


图4 小鼠肾脏组织 HE 染色 (100 ×)

3.7 鸭嘴花碱最大耐受量对小鼠生化指标的影响

与空白组比较, 鸭嘴花碱MTD组生化检测ALT和Cre无显著性差异 ($P > 0.05$); AST和BUN呈现

降低趋势, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 结果见图5。结果表明, 鸭嘴花碱MTD组AST、BUN含量呈现降低趋势, ALT、Cre含量无明显影响。



注: 采用 *t* 检验: 与空白组比较, * $P < 0.05$ 。

图5 鸭嘴花碱最大耐受量对小鼠生化指标的影响

4 讨论

经口单次给药毒性试验是指1次给予动物受试药物,观察动物在一定时间内(14天中)出现的毒性反应程度或死亡情况,是毒性研究的第一步。MTD是指动物能够耐受而不引起动物死亡的最高剂量^[11]。本实验依据《中药毒性理论与安全性评价》,对鸭嘴花碱的毒性进行试验研究,探寻小鼠对鸭嘴花碱的最大耐受量,初步评价鸭嘴花碱毒性与安全性。急性毒性试验中,观察小鼠出现的异常情况和不良反应,判断可能涉及的组织器官病变。体质量增长可以反映小鼠的饮食、生长状态情况,可作为动物健康的评价指标^[12];脏器指数在一定程度上可以反映各脏器功能强弱、机体免疫和化学药物对脏器的影响^[13];肝脏和肾脏是人体最重要的代谢器官,它们对清除体内代谢产物、废物和毒物起着关键作用,肝脏与机体免疫功能密切相关,肾脏对维持机体渗透压、酸碱平衡起着重要作用^[14-15]。血液生化指标能够反映小鼠的代谢及生物状态,AST和ALT是评价肝脏功能损伤的指标,BUN和Cre是评价肾脏是否损伤的指标^[16]。肝肾毒性,是评价机体和组织器官病变的重要指标,也是动物健康的评价指标之一。一般病理学检查可以观察脏器的组织结构形态、病理情况、器官病变等,是评价脏器能否运行正常功能的重要参考。

研究表明,小鼠对鸭嘴花碱的MTD为 $153.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,在该给药剂量时,小鼠未出现明显的中毒症状,无死亡发生,对小鼠摄食、体质量增长、脏器指数无明显影响;病理结果显示,未出现肝肾毒性病理病变;小鼠血液生化指标中ALT、Cre无明显影响;AST、BUN有降低的趋势,但不一定就存在肝肾毒性,可能与药物对肝脏、肾脏的治疗作用有关,其对小鼠生化指标的影响原因尚不清楚,需要进一步研究。综上所述,鸭嘴花碱药物浓度为 $153.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,按照最大给药体积给药,小鼠短期内不会出现毒性反应,该剂量为安全剂量。

参考文献:

[1] 朱成兰. 傣药鸭嘴花的药理作用和临床应用[C]// 全国民

族民间医药学术研讨会论文集. 重庆, 2005: 69.

- [2] 范治国, 黄毅岚, 谢川黔. 鸭嘴花化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2008(6): 464-465.
- [3] 罗晴方, 王文祥, 干志强, 等. 藏药鸭嘴花的化学成分研究[J]. 中药材, 2020, 43(8): 1890-1893.
- [4] Zhu Y, Liu W, Qi S, et al. Stereoselective Glucuronidation Metabolism, Pharmacokinetics, Anti-amnesic Pharmacodynamics, and Toxic Properties of Vasicine Enantiomers in Vitro and in Vivo[J]. Eur J Pharm Sci, 2018, 123: 459-474.
- [5] 刘伟, 程雪梅, 王峥涛, 等. 鸭嘴花碱的资源、药理活性、毒性、药代动力学及分析方法研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2013, 40(4): 386-395.
- [6] Joshi BS, Bai Y, Puar MS, et al. ¹H- and ¹³C-Nmr Assignments for Some Pyrrolo2, 1bquinazoline Alkaloids of Adhatoda Vasica[J]. J Nat Prod, 1994, 57(7): 953-962.
- [7] 赵欣. 骆驼蓬氨基酸成分累积规律及其对鸭嘴花碱急性毒性和药动学的影响[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2015.
- [8] 查青, 陈燕妮, 史海龙, 等. 土贝母急性毒性实验研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(4): 41-46.
- [9] 占堆, 魏荣锐, 马勤阁, 等. 西藏凹乳芹根, 叶提取物的急性及亚急性毒性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(7): 8.
- [10] 孙宇, 张典, 王园, 等. 远志地上部分急性毒性实验研究[C]// 陕西省毒理学会防控瘟疫与毒物危害学术研讨会论文集. 西安, 2020: 82-90.
- [11] 严妍, 吴娟, 焦月华, 等. 毒性中药复方临床安全性再评价的思考[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(15): 1762-1766.
- [12] 特日格乐, 苏龙嘎, 齐和日玛, 等. 蒙药三味阿拉坦其其格散的急性毒性试验[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(10): 36-40.
- [13] 陈艳华, 蒋霞, 陆洪艳. 朝天罐总酚的小鼠急性毒性实验研究[J]. 湖南中医杂志, 2020, 36(11): 189-191.
- [14] 李明明, 孟祥翠, 刘娟. 4种动物肾脏组织形态结构比较[J]. 安徽农学通报, 2020, 26(16): 30-33, 103.
- [15] 孙亚楠, 曾昊, 李思琪, 等. 中华竹鼠肝脏的组织结构[J]. 经济动物学报, 2019, 23(3): 157-160, 165.
- [16] 吴海港, 张梦瑶, 胡玉妍, 等. 苦参碱急性毒性试验及对小鼠血液生理生化指标影响[J]. 中国饲料, 2020(23): 40-43.

(收稿日期 2022年12月27日 编辑 肖妍)