

文章编号:1001-6880(2016)5-0786-05

精氨酸双糖苷对小鼠毒性实验研究

宋明铭¹,王佳奇¹,孙荣花¹,丁传波^{1,2},刘文丛^{1*},郑毅男^{1*}¹吉林农业大学,长春 130118; ²吉林省珲春神州药业有限公司,珲春 133300

摘要:为观察精氨酸双糖苷(AFG)毒性反应,通过高效阳离子柱洗脱纯化 AFG,ICR 小鼠 80 只,随机分为 4 组,每组 20 只,雌雄各半。各组分别灌胃给予生理盐水,AFG 30 mg/kg、2 g/kg、6 g/kg,每天给药一次,连续给药 90 d,并观察各组小鼠的状态。各组给药结束后,眼球取血,处死,解剖检查,取材、制片和 H. E 染色进行病理学检查。结果显示,AFG 6 g/kg 组,连续给药 60 d 后,个别小鼠出现眼睛红肿,行动缓慢等现象。AFG 低、中、高剂量组连续给药 90 d 后,与空白对照组比较,各剂量组体重变化和食物消耗量无显著性差异,AFG 6 g/kg 组肝、脾指数明显降低($P < 0.01, P < 0.05$) ;血液生化指标的测定中,AFG 30 mg/kg、2 g/kg 组肌酐明显上升($P < 0.05$),AFG 6 g/kg 组谷丙转氨酶、谷草转氨酶升高($P < 0.05$),甘油三酯明显升高($P < 0.01$)。其它血液生化指标与空白对照组比较无显著性差异。现有数据表明,90 d 内服用 AFG 对小鼠生理活性和状态无明显毒性作用。

关键词:精氨酸双糖苷; ICR 小鼠; 长期毒性实验

中图分类号:R285. 1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.5.027

Study on the Toxicity of Argininyl-Fructoul-Glucose in Mice

SONG Ming-ming¹, WANG Jia-qi¹, SUN Rong-hua¹, DING Chuan-bo^{1,2}, LIU Wen-cong^{1*}, ZHENG Yi-nan^{1*}¹Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;²Hunchun Shenzhou Pharmaceutical Group Company Limited, Hunchun 133300, China

Abstract: The aim of this study was to observe the long-term toxicity of argininyl-fructoul-glucose (AFG) in mice. A total of 80 ICR mice, were randomly divided into 4 groups, 20 mice in each group, half male and half female. Each group were lavaged with physiological saline, AFG 30 mg/kg, 2 g/kg and 6 g/kg, once a day, last for 90 days, and all animals were daily monitored for abnormalities and mortality. After 90 days, in order to obtain the information on the progression of toxicological changes, mice were fasted for 12h and were subsequently sacrificed by exsanguination followed by a full, detailed gross necropsy. Embedded tissues were sectioned to approximately 5-6 μm in thickness, stained with hematoxylin and eosin (H&E) before they were examined under a microscope. After administration for 60 days, some mice in AFG 6 g/kg group appeared of eyes redness, slow action and other phenomena. Compared with the control group, no significant differences in weight change and food consumption were detected in AFG 30 mg/kg, 2 g/kg and 6 g/kg group. The liver and spleen index of AFG 6 g/kg group decreased significantly ($P < 0.01, P < 0.05$) for serum chemistry analyses, Creal of AFG 30 mg/kg and 2 g/kg groups increased significantly ($P < 0.05$), the ALT and AST of AFG 6 g/kg group increased ($P < 0.05$), TG also rise obviously ($P < 0.01$). Other blood biochemical indexes of sample groups had no significant difference with these of control group. The existing data showed that the 90 d in the use of AFG had no obviously toxicity in mice.

Key words: argininyl-fructoul-glucose; ICR mice; long-term toxicity

精氨酸双糖苷(arginyl-fructosyl-glucose, AFG),是郑毅男^[1]首次从红参中获得,是鲜人参加工成红参的过程中,精氨酸与麦芽糖发生美拉德反应形成的一种葡糖胺重排的中间产物^[2],在红参中含量丰

富^[3],最高可达 4% 以上,其结构为 1'-(精氨酸-N²基)-1'-去氧-4'-O(α-D-吡喃葡萄糖基)-D-果糖^[4]。实验研究表明,AFG 具有增强免疫^[5]、促进 NO 生成,抑制小肠麦芽糖酶活性。同时,AFG 对 2 型糖尿病大鼠具有很好的降血糖活性^[6]。这一研究大大提高了人参非皂苷类物质的地位。日本研究发现^[7] AFG 能够抑制肿瘤坏死因子 TNF-α 产生,抑制环氧合酶 2,促进 I/IV 型胶原蛋白产生,能促进生成

收稿日期:2015-12-17 接受日期:2016-04-15

基金项目:国家科技部科技型中小企业技术创新基金(13C262 12201221);吉林省医药产业发展引导资金专项(20150311050YY)

* 通讯作者 Tel:86-013086996620; E-mail:zhenyinan@126.com

透明质酸,抗衰老、增加皮肤弹性、保湿润泽等作用。因此,AFG 具有很高的开发价值。本研究通过对小鼠连续 90 d 灌胃给药进行观察,对 AFG 长期毒性进行探讨,为其深入研究打下基础,同时为产品开发和临床治疗安全提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

精氨酸双糖苷(AFG),自制,纯度大于 95%,临用时用纯净水配制成高、中、低剂量所需浓度。

1.2 仪器

万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);水浴恒温振荡器(上海龙跃仪器设备有限公司);冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);LC-2010A 高效液相色谱仪(LC solution 工作站、SPD-20A 紫外检测器、LC-20AT 泵,CTO-10AS VP 柱温箱,日本岛津公司);TGL-20B 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);全自动酶标仪(南京华东电子集团医疗装备有限责任公司)。

1.3 动物

4 周龄 ICR 小鼠 80 只,SPF 级(18~22 g),购自吉林省亿斯实验动物中心,许可证号为 SCXK-(吉)-2011-0004。雌雄动物分笼饲养,饲养条件为温度 23 ± 2 ℃,湿度为 55 ± 5%,实验用水为去离子水,饲料为普通饲料。

1.4 实验方法

1.4.1 AFG 制备

取 L-精氨酸 20 g,麦芽糖 40 g,柠檬酸 15 g,溶于 200 mL 丙三醇中,摇匀,于 80 ℃ 水浴条件下反应 90 min,得 AFG 总合成物,上样于高效阳离子柱,1.5% 氨水洗脱,部分接收器接样,分批处理后,样品通过 HPLC 测得纯度,真空冷冻干燥机冻干为白色粉末。

1.4.2 小鼠长期毒性

1.4.2.1 分组及剂量

ICR 小鼠 80 只,适应性饲养一周后,雌雄随机分为 4 组,每组 20 只,雌雄各半,即空白对照组、AFG 低剂量组(30 mg/kg)、AFG 中剂量组(2 g/kg)、AFG 高剂量组(6 g/kg)。AFG 30 mg/kg 剂量组为有效剂量;AFG 2 g/kg 剂量组为预试验剂量,效果很好,因此选择此剂量;AFG 6 g/kg 剂量组的选择参考文献报道人工合成 AFG 的急性毒性实验,

测得小鼠最大耐受量为 6 g/kg^[8]。

1.4.2.2 试验设计

各组每日按 10 mL/kg 体重给小鼠灌胃给药,每天给药一次,连续给药 90 d,按体重给药。每天固定时间给药,并观察小鼠的精神状态,外观体征,排泄物,记录死亡数量等情况。每周称量一次体重、给食量、给水量、剩食量及剩水量,用给食量减去剩食量,计算每周的食物消耗,利用 SPSS17.0 软件进行分析,得出 90 d 的平均食物消耗量。末次给药 12 h 后,眼球取血处死后进行系统的解剖,取心、肝、脾、肺、肾、胃、肠、生殖器官、胸腺进行称重并计算脏器指数。采集的血样进行血液生化学指标的测定,将以上器官保存在 10% 甲醛溶液中,进行随后的组织病理学检查。

1.5 统计学方法

采用 SPSS17.0 应用软件进行分析,数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析法,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 AFG 对小鼠状态的影响

与空白对照组比较,AFG 30 mg/kg、2 g/kg 组所有存活小鼠,均无不良反应,所有行为均与正常小鼠无差别。AFG 6 g/kg 组,给药 60 d 后,4 只雄性小鼠,2 只雌性小鼠出现眼睛红肿,行动缓慢等现象,停药后,皆可自行恢复。

2.2 AFG 对小鼠死亡率的影响

实验结束后,AFG 30 mg/kg、2 g/kg 组,与空白组比较,小鼠死亡情况无显著性差别。AFG 6 g/kg,小鼠死亡数多于空白对照组,如表 1 所示。

2.3 AFG 对小鼠体重及食物消耗的影响

各组小鼠体重均呈现稳定性增长,AFG 6 g/kg 组体重低于空白对照组,AFG 2 g/kg 组略高于空白对照组,但均无显著性差异,如表 2 所示。

三个剂量组食物消耗(19.4 ± 2.4 、 17.6 ± 2.4 、 18.9 ± 2.9 g)与空白对照组(19.0 ± 2.9 g)基本相似,AFG 2 g/kg、AFG 6 g/kg 组略低于空白对照组,但均无显著性差异。

2.4 AFG 对小鼠脏器指数的影响

如表 3 所示,与空白对照组比较,AFG 6 g/kg 组肝、脾的脏器指数明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。其他剂量组与空白对照组比较,无明显差异。

表 1 AFG 对小鼠死亡率的影响

Table 1 Effect of AFG on mortality of mice

组别 Group	总数 Total	死亡数 Mortality	死亡率 Mortality rate(%)
空白对照 Control	20	3	15
AFG 30 mg/kg	20	3	15
AFG 2 g/kg	20	4	20
AFG 6 g/kg	20	6	30

表 2 AFG 对小鼠体重的影响($\bar{x} \pm s$)Table 2 Effect of AFG on body weight of mice($\bar{x} \pm s$)

周数 Weeks	体重 Body weight(g)			
	空白对照 Control	AFG 30 mg/kg	AFG ² g/kg	AFG ⁶ g/kg
0	19.4 ± 0.7	18.9 ± 1.2	19.7 ± 1.0	19.3 ± 0.9
1	25.2 ± 2.5	25.9 ± 1.4	26.4 ± 1.5	26.0 ± 0.9
2	28.6 ± 1.9	28.0 ± 2.6	29.1 ± 2.0	26.7 ± 1.5
3	29.2 ± 2.4	28.7 ± 2.5	30.2 ± 4.2	28.1 ± 1.9
4	29.2 ± 3.7	30.2 ± 3.4	31.8 ± 3.6	28.7 ± 2.0
5	30.3 ± 3.6	30.1 ± 2.8	33.1 ± 4.4	29.8 ± 2.8
6	30.3 ± 3.6	30.8 ± 2.8	33.1 ± 4.7	28.9 ± 1.3
7	31.6 ± 4.7	31.7 ± 3.1	34.1 ± 5.1	28.7 ± 2.0
8	32.5 ± 4.2	31.7 ± 4.1	33.0 ± 4.7	29.8 ± 2.8
9	32.8 ± 4.3	32.8 ± 4.0	34.2 ± 5.0	34.2 ± 5.0
10	32.6 ± 5.4	33.4 ± 3.8	34.0 ± 6.5	31.3 ± 4.0
11	34.3 ± 6.2	33.2 ± 4.1	34.5 ± 5.3	33.0 ± 3.9
12	34.7 ± 4.8	33.2 ± 4.3	34.7 ± 5.5	33.4 ± 3.6
13	34.5 ± 5.7	32.7 ± 3.1	34.6 ± 6.2	33.5 ± 4.1

表 3 AFG 对小鼠脏器指数的影响($n = 14$, $\bar{x} \pm s$)Table 3 Effects of AFG on the relative organ weights of mice($n = 14$, $\bar{x} \pm s$)

脏器指数 Organ weight ratio	空白对照 Control	AFG 30 mg/kg	AFG ² g/kg	AFG ⁶ g/kg
心 Heart	0.52 ± 0.04	0.53 ± 0.05	0.56 ± 0.05	0.52 ± 0.02
肝 Liver	4.50 ± 0.20	4.60 ± 0.42	4.60 ± 0.16	4.30 ± 0.14 * *
脾 Spleen	0.63 ± 0.05	0.68 ± 0.07	0.64 ± 0.10	0.47 ± 0.06 *
肺 Lungs	0.65 ± 0.06	0.63 ± 0.05	0.64 ± 0.03	0.63 ± 0.02
肾 Kidneys	1.25 ± 0.11	1.27 ± 0.08	1.35 ± 0.16	1.14 ± 0.12
胃 Stomach	1.22 ± 0.10	1.14 ± 0.11	1.16 ± 0.20	1.22 ± 0.18
胸腺 Thymus	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.18 ± 0.05

注:与空白对照组比较,差异显著, * $P < 0.05$; 差异极显著, ** $P < 0.01$; 脏器指数 = 脏器重量(g) × 100/体重(g)。

Note: compared with control group, * $P < 0.05$ significant difference; ** $P < 0.01$ extremely significant difference; Organ index = organ mass(g) × 100/body mass(g)

2.5 AFG 对小鼠血液生化学指标的影响

如表 4 所示,与空白对照组比较,AFG 30 mg/kg 组肌酐明显上升($P < 0.05$),AFG 2 g/kg 组肌酐明显上升

($P < 0.05$),AFG 6 g/kg 组谷丙转氨酶和谷草转氨酶上升($P < 0.05$),甘油三酯明显升高($P < 0.01$)。其余各项指标,与空白对照组比较无显著性差异。

表 4 AFG 对小鼠血液生化指标的影响($\bar{x} \pm s, n=14$)
Table 4 Effects of AFG on blood biochemical of mice($\bar{x} \pm s, n=14$)

生化指标 Biochemical indicator	空白对照 Control	AFG 30 mg/kg	AFG 2 g/kg	AFG 6 g/kg
ALT(U/L)	20.42 ± 2.01	20.77 ± 2.11	21.11 ± 1.80	$23.38 \pm 3.03^*$
AST(U/L)	29.92 ± 0.86	29.23 ± 3.49	31.02 ± 2.12	$33.12 \pm 3.54^*$
BUN(mmol/L)	3.63 ± 0.45	3.15 ± 0.97	3.99 ± 0.76	3.36 ± 0.43
CRE(μmol/L)	31.35 ± 3.47	$35.25 \pm 1.65^*$	$36.52 \pm 3.72^*$	33.34 ± 1.98
TG(mmol/L)	0.99 ± 0.13	1.01 ± 0.12	1.02 ± 0.18	$1.13 \pm 0.10^{**}$
CHOL(mmol/L)	4.07 ± 0.94	3.79 ± 0.48	4.40 ± 0.88	4.58 ± 0.27

注:与空白对照组比较,差异显著, $^* P < 0.05$;差异极显著, $^{**} P < 0.01$ 。

Note: compared with control group, $^* P < 0.05$ significant difference; $^{**} P < 0.01$ extremely significant difference.

2.6 组织病理学检测

解剖后,观察各给药组小鼠心、肝、脾、肺、肾、胃、肠、卵巢/睾丸等脏器,并未发现肿胀、充血、坏死等病变更象,各脏器表面光滑、色泽正常。切片,HE

染色后,与空白对照组比较,各剂量组各脏器均未发生坏死、炎症等一系列病理改变。如下图所示,AFG 6 g/kg 与空白对照组各脏器对比图。

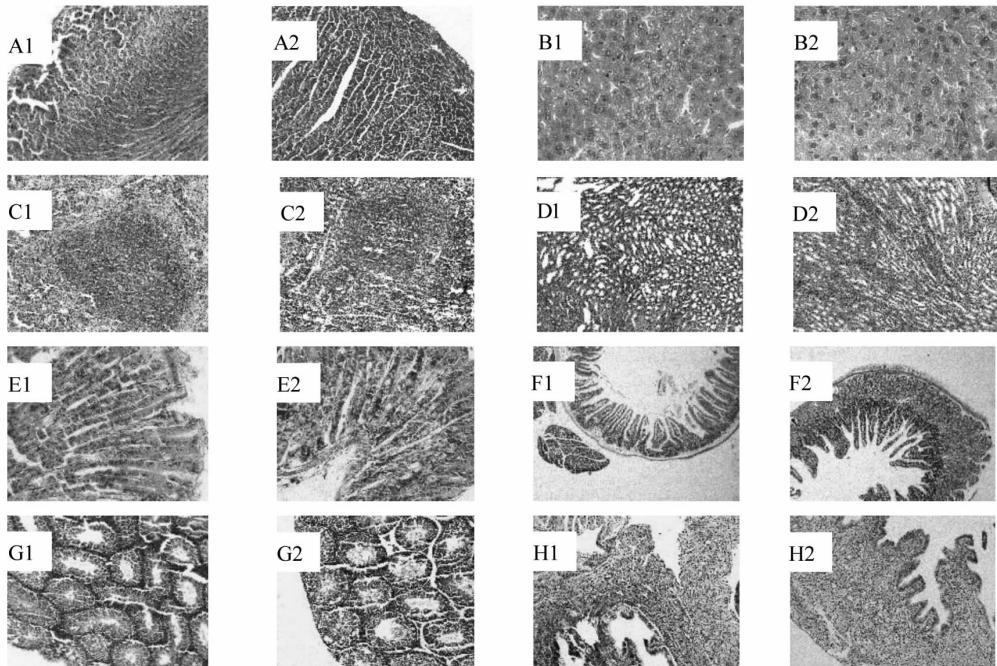


图 1 小鼠心(A)、肝(B)、脾(C)、肾(D)、胃(E)、肠(F)、睾丸(G)和卵巢(H)的组织病理学观察(HE $\times 100$,HE $\times 400$)

Fig. 1 Histopathological observation of heart (A), liver (B), spleen (C), kidneys (D), stomach (E), intestines (F), testis (G) and ovaries (H) in mice (HE $\times 100$, HE $\times 400$)

注:A₁、B₁:空白对照组,A₂、B₂:AFG 6 g/kg;C₁、D₁:空白对照组,C₂、D₂:AFG 6 g/kg;E₁、F₁:空白对照组,E₂、F₂:AFG 6 g/kg;G₁、H₁:空白对照组,G₂、H₂:AFG 6 g/kg

Note: A₁, B₁: normal control group, A₂, B₂: AFG 6 g/kg; C₁, D₁: normal control group, C₂, D₂: AFG 6 g/kg; E₁, F₁: normal control group, E₂, F₂: AFG 6 g/kg; G₁, H₁: normal control group, G₂, H₂: AFG 6 g/kg

3 讨论

精氨酸双糖苷是氨基酸衍生物的一种,其药理活性主要有:免疫调节^[9,10],抑制小肠麦芽糖酶的活性^[11,12],抑制肿瘤坏死因子 TNF- α 产生^[12],促进 I-

IV 型胶原蛋白产生等作用^[13]。研究发现,AFG 无急性毒性作用,文献报道^[8],连续 7 d 灌胃给药最大浓度和最大体积 AFG,KM 小鼠无死亡情况(测得其最大耐受量为 6 g/kg,与成人日用入参量 3~9 g 相比,相当于成人人参日用量的 4~13 倍)。AFG 在

大鼠体内的药代动力学显示^[14],不同剂量的 AFG 在大鼠体内的药代动力学过程存在差异,但在大鼠体内消除较快,不易积蓄,尿液排泄为其重要的排泄方式。

小鼠明显毒性症状,主要表现为:呼吸急促、抽搐(溴苯腈对小鼠的毒性及二硫丙磺钠对其的保护作用)、腹泻、排泄量增加甚至大小便失禁、摄食减少、运动迟缓、精神萎靡不振甚至昏迷,并且频繁死亡^[15]。对其脏器的影响主要表现为:心脏色泽不均,心肌纤维肿胀,部分坏死;肝脏肿胀,肝脏各分叶粘连,肝窦隙可见大量红细胞和少量淋巴细胞浸润;脾脏体积增大,脾窦扩张充血,脾小体萎缩或消失;肾脏肿大,肾间质血管扩张、充血,有单核细胞、淋巴细胞等浸润;胃肠及腹壁粘连等症状^[16,17]。对血液生化指标的影响主要为:血清中谷丙转氨酶、谷草转氨酶、碱性磷酸酶、乳酸脱氢酶活性、尿素氮和肌酐含量增高^[17]。

本研究结果显示,AFG 6 g/kg 剂量组,肝脏指数、脾脏指数,与空白对照组比较,存在显著性差异($P < 0.01, P < 0.05$);谷丙转氨酶和谷草转氨酶含量显著增高($P < 0.05$),甘油三酯含量存在极显著性差异($P < 0.01$),但病理学切片没有明显的病变,且患有眼睛红肿病状的 5 只小鼠停止给药后,眼睛红肿症状消失。本实验结果表明,精氨酸双糖苷 AFG 90 d 内服用无明显毒性作用,具有较好的安全性。但长期服用 AFG,剂量过大,可能会产生一定影响,有待进一步研究探讨。

参考文献

- 1 Zheng YN(郑毅男), Matsuura Y(松浦幸永), Han LK(韩立坤), et al. Isolation and identification of Compound Radix -arginine derivatives. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1996, 31:191-195.
- 2 Teng R, Ang C, McManus D, et al. Regioselective acylation of ginsenosides by Novozyme. *Tetrahedr Lett*, 2003, 44:5661-5664.
- 3 Gao FF, Zhang WY, Liu LM, et al. Detection and distribution of arginine derivatives in *Panax quinquefolius* L and investigations of their antioxidant properties. *Food Sci Technol*, 2012, 49:34-41.
- 4 Cao GJ(曹国军), XU CL(许传莲), Zheng YN(郑毅男). Ginseng processing and formation of arginyl-fructosyl-glucose. *J Chin Med Mater*(中药材), 2003, 26(2):97-98.
- 5 Ha KS, Jo SH, Kang BH, et al. In vitro and in vivo antihyperglycemic effect of 2 amadori rearrangement compounds, arginyl-fructose and arginyl-fructosyl-glucose. *J Food Sci*, 2011, 76:H188-193.
- 6 Zheng YN(郑毅男), Yang SJ(杨世杰). Preparation method of arginyl-fructosyl-glucose and application in anti-diabetes. CN201110038843.7
- 7 Iwasaki H, Zhou YY, Iwahashi H, et al. Maltulosyl arginine and fructosyl arginine as anti-inflammatory drugs, anti-aging agents, nitrogen monoxide production stimulators, and skin cosmetics. *Iwasaki, JP* 2008-263461.
- 8 Qi JH(齐晶华), Zheng YN(郑毅男), Liu WC(刘文丛). Acute toxicity test of synthetic arginyl-fructosyl-glucose. *Ginseng Res*(人参研究), 2013, 239-240.
- 9 People's Republic of China Pharmacopoeia Committee of Ministry of Health(药典委员会). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*(中华人民共和国药典). Beijing: Chemical Industry Press, 2015.
- 10 Young JH, Nayoung K, Karim L, et al. Korean red ginseng (*Panax ginseng*) ameliorates type 1 diabetes and restores immune cell compartments. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144: 223-225.
- 11 Jung SL, Gyo NK, Sang HL, et al. In vitro and cellular antioxidant activity of arginyl-fructose and arginyl-fructosyl-glucose. *Food Sci Biotechnol*, 2009, 6:1505-1510.
- 12 Yool BC, Park GH, Okuda, H, et al. Inhibitory effect of arginine-derivatives from ainseng extract and basic amino acids on protein-arginine N-methyltransferase. *Amino Acids*, 1999, 17:391-400.
- 13 Han LK, Saito M. Tyrosinase activity inhibitor and melanin production inhibitor containing arginyl fructosyl glucose, and use thereof; JP, 2012140376A. 2012-07-26.
- 14 Wang K(王昆), Xu XH(徐晓华), Li JQ(李佳琪), et al. Study on pharmacokinetics of arginyl-fructosyl-glucose in rats. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报), 2014, 36: 213-218.
- 15 Qu PF(曲鹏飞). Effect of edaravone on acute CO poisoning mice brain tissue MDA, SOD, GSH-PX and Caspase-3 level of influence. Jinan: Shandong University(山东大学), PhD. 2012.
- 16 Li JS(李江课题). Toxicity study of SD mice and chickens. Shaanxi: North West Agriculture and Forestry University(西北农林科技大学), MSc. 2008.
- 17 Li L(李荔), Zhang YD(张彦定), Zhang KX(张开兴), et al. To observe the poisoning symptoms and pathological changes of visceral organs in the form of mercuric chloride in mice. *J Northwest Normal Univ* (西北师范大学学报), 1996, 4;17-18.
- 18 Luo MG(罗明刚). Mice acute and cumulative test of olaquindox poisoning. Yaan: Sichuan Agricultural University(四川农业大学), MSc. 2008.