

苦豆碱对小鼠的急性毒性研究

卢子滨¹, 范春林², 周红玲¹, 禹志领³, 余林中¹, 刘俊珊^{1,3*}

¹南方医科大学中医药学院中药药理教研室; ²暨南大学药学院药物化学教研室, 广州 510515;

³香港浸会大学中医药学院岑尧宽岑碧泉纪念癌症炎症研究中心, 香港 999077

摘要: 本文拟探讨苦豆碱对小鼠的急性毒性, 并明确其半数致死量(LD₅₀)以及毒性靶器官。采用腹腔注射给药方式, 给予 600.00、480.00、384.00、307.20、245.76 mg/kg 的苦豆碱, 实验后观察 7 d, 记录体重变化及自主活动情况, 检测苦豆碱对小鼠的急性毒性作用, 用加权回归几率法(Bliss)计算 LD₅₀, 并对死亡小鼠进行主要脏器的病理学检查。结果显示, 苦豆碱的小鼠 LD₅₀ 为 395.62 mg/kg, 95% 可信限为 305.23 ~ 535.04 mg/kg, LD₅ 为 143.00 mg/kg, LD₉₅ 为 1094.47 mg/kg。7 d 内小鼠体重有增长趋势。病理结果显示, 苦豆碱对小鼠的主要毒性靶器官为肝脏。

关键词: 苦豆碱; 急性毒性实验; LD₅₀; 病理变化

中图分类号: R962

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.5.018

Acute Toxicity of Aloperine on Mice

LU Zi-bin¹, FAN Chun-lin², ZHOU Hong-ling¹, YU Zhi-ling³, YU Lin-zhong¹, LIU Jun-shan^{1,3*}

¹School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University; ²College of Pharmacy, Jinan University; Guangzhou 510515, China; ³Shum Yiu Foon Shum Bik

Chuen Memorial Centre for Cancer and Inflammation Research, School of Chinese Medicine, Hong Kong Baptist University, Hong Kong 999077, China

Abstract: To explore the acute toxicity of aloperine in mice and to determine the median lethal dose (LD₅₀) and the potential target organs. The mice were intraperitoneally administered with aloperine at the concentrations of 600.00, 480.00, 384.00, 307.20, 245.76 mg/kg and observed for toxic manifestations, respectively. LD₅₀ was determined by Bliss method. The survived mice were observed for toxic manifestations for 7 d. The main organs of dead mice (heart, liver, spleen, lung and kidney) were dissected immediately for pathological observation. The LD₅₀ value of aloperine in mice was 395.62 mg/kg (95% confidence interval 305.23 ~ 535.04 mg/kg) with the LD₅ value of 143.00 mg/kg and LD₉₅ value of 1094.47 mg/kg. Liver might be the target organ which was heavily damaged. The work provides experimental basis for further research.

Key words: Aloperine; acute toxicity test; LD₅₀; pathological changes

中药苦豆子是豆科槐属植物苦豆子 (*Sophora alopecuroides* L.) 的干燥全草、根及种子, 又名苦豆草、苦豆根、苦甘草、西豆根等^[1]。该药性寒, 味苦, 有毒, 具有清热解毒、抗菌消炎作用。苦豆子中主要含有喹诺里西丁类生物碱, 其中苦豆碱(aloperine, ALO)是其代表性生物碱之一^[2]。药理研究发现, 苦豆碱有抗炎、降压、抗病毒、抗肿瘤等作用^[3-5], 但腹腔注射苦豆碱的急性毒性研究尚未有报道, 为此笔

者采用急性毒性动物模型, 观察苦豆碱对小鼠的急性毒性, 并通过病理学指标确定其毒性靶器官, 为后续研究提供实验依据。

1 材料与仪器

昆明小鼠, 无特定病原体(SPF)级, 体重 18 ~ 22 g, 雌雄各半, 购自南方医科大学实验动物中心, 许可证号: SCXK(粤)2011 - 0015, 分笼常规饲养, 自由进食饮水, 光照时间为自然日照时长, 适应环境 3 d 后开始实验。苦豆碱由本实验室分离获得, 纯度 > 99%; 0.9% 氯化钠注射液(广东利泰制药股份有限公司, 批号 1512332); IX53 倒置光学显微镜, 日本

收稿日期: 2017-01-20 接受日期: 2017-03-22

基金项目: 国家自然科学基金(81402801); 广东省自然科学基金(2014A030310250); 广东省“创新强校工程”项目(C1031898); “香江学者”人才培养计划(XJ2016059)

* 通信作者 Tel: 86-20-61648262; E-mail: liujunshanty@163.com

Olympus 公司;JA2603N 电子天平,上海佑科仪器仪表有限公司;RM2235 切片机,德国 Leica 公司。

2 实验方法

2.1 苦豆碱急性毒性实验方法

72 只小鼠随机分为 6 组,每组 12 只,雌雄各半,分别为正常对照组、苦豆碱 600.00、480.00、384.00、307.20、245.76 mg/kg 组,实验前禁食不禁水 12 h。苦豆碱采用无菌生理盐水溶解,浓度为 60 mg/mL,使用前稀释为 48、38.4、30.72、24.58 mg/mL,腹腔注射给药体积按 0.1 mL/10 g 计算,正常对照组给予等体积蒸馏水。腹腔注射苦豆碱后,即刻按照一般观察项目指征指导原则^[6]观察动物,包括动物外观、活动状态、精神状态、食欲、排泄情况及其鼻、眼、口有无异常分泌物以及死亡情况等。随后每天记录小鼠死亡情况,连续观察 7 d。对死亡动物,立即进行解剖,对主要脏器进行肉眼观察,迅速摘取心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏等组织,置于中性固定液中固定,以作后续检查。

2.2 统计方法

使用 SPSS17.0 软件,将实验所得数据用加权回归几率法 (Bliss) 计算 LD₅₀、95% 可信限,LD₅ 和

LD₉₅。评估苦豆碱对小鼠的急性毒性。

2.3 病理片制作方法

取新鲜脏器置于中性固定液中固定,常规方法脱水、石蜡包埋、切片,使用苏木精-伊红 (HE) 染色,封片后光镜下观察各组织的病理现象。

3 实验结果

3.1 一般情况

本次急性毒性实验的各剂量组均出现不同程度的中毒反应,各组均出现小鼠死亡,中毒反应及死亡呈剂量-反应关系,正常对照组无异常反应。腹腔注射 10 ~ 120 min 内,600.00、480.00、384.00 和 307.20 mg/kg 组死亡小鼠出现活动减少、部分小鼠出现痉挛、抽搐、腹式呼吸、四肢发绀、眼球突出等中毒反应,详情见表 1。死亡小鼠多出现在 2 h 内。根据各组小鼠的死亡数,用 Bliss 法计算得回归方程 y (Probit) = $-9.67 + 6.756x$, Pearson 模型拟合优度检验 $\chi^2 = 0.344$, $P = 0.952$,表明模型拟合良好。苦豆碱的半数致死量 LD₅₀ 为 395.62 mg/kg,95% 可信限为 305.23 ~ 535.04 mg/kg,LD₅ 为 143.00 mg/kg,LD₉₅ 为 1094.47 mg/kg。详情见表 2。

表 1 不同剂量苦豆碱腹腔注射给药后小鼠的情况观察

Table 1 Observation of mice after intraperitoneal injection of aloperine at different doses

指征 Symptom	剂量 Dose (mg/kg)				
	245.76	307.20	384.00	480.00	600.00
给药后死亡数(雄/雌) Death after treatment (M/F)	2/1	2/2	2/3	4/3	5/4
腹式呼吸 Abdominal breathing	4	6	7	9	12
四肢紫绀 Cyanosis of limb	3	4	5	7	12
唾液分泌过多 Hypersalivation	1	3	6	8	12
运动减少 Hypokinesia	3	4	7	10	12
阵挛发作 Clonic seizure	3	5	7	8	12
眼球突出 Exophthalmos	3	4	6	8	12

表 2 Bliss 法计算苦豆碱对小鼠的半数致死量表

Table 2 The LD₅₀ of aloperine in mice by Bliss method

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	剂量对数 Logarithmic 10 dose (x)	小鼠数 Number of mice	死亡小鼠数 Number of dead	死亡率 Mortality rate (%)
1	600.00	2.78	12	9	75.00
2	480.00	2.68	12	7	58.33
3	384.00	2.58	12	5	41.67
4	307.20	2.49	12	4	33.33
5	245.76	2.39	12	3	25.00

3.2 病理情况

小鼠死亡后剖检,肉眼观察可见心脏、脾脏、肺脏、肾脏大都正常。图1所示,A、C、E、G、I依次为正常对照组小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏病理切片,B、D、F、H、J依次为死亡小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏病理切片。病理结果提示,正常小鼠肝组织结构正常,无明显变性、坏死及炎症细胞浸润,死亡小鼠肝脏出现较广泛区域的核固缩、核缩小、凝聚,呈深蓝染。正常小鼠,死亡小鼠心脏、脾脏、肺脏、肾脏形态结构完整,大致正常。未死亡小鼠给药后观察7 d,小鼠毛色恢复、活动自如,饮食正常、大小便正常、无异常分泌物、无不良反应。与正常对照

组比较,4组雄性小鼠体重明显上升,于给药第7 d恢复正常,其余各组小鼠每天的生长体重和正常对照组,差异无明显变化,详情见表3。与正常对照组比较,第3组雌性小鼠于第3 d,第7 d体重增加明显下降,其余各组小鼠每天的增长体重和正常对照组,差异无明显变化,详情见表4。

4 讨论

苦豆碱为苦豆子中的代表性生物碱之一,在结构上属喹诺里西丁类生物碱。近年来,苦豆碱的药理研究已取得了较大的进展,显示了其具有抗炎、镇痛、抗肿瘤等作用。为了更好地开发、利用传统中药

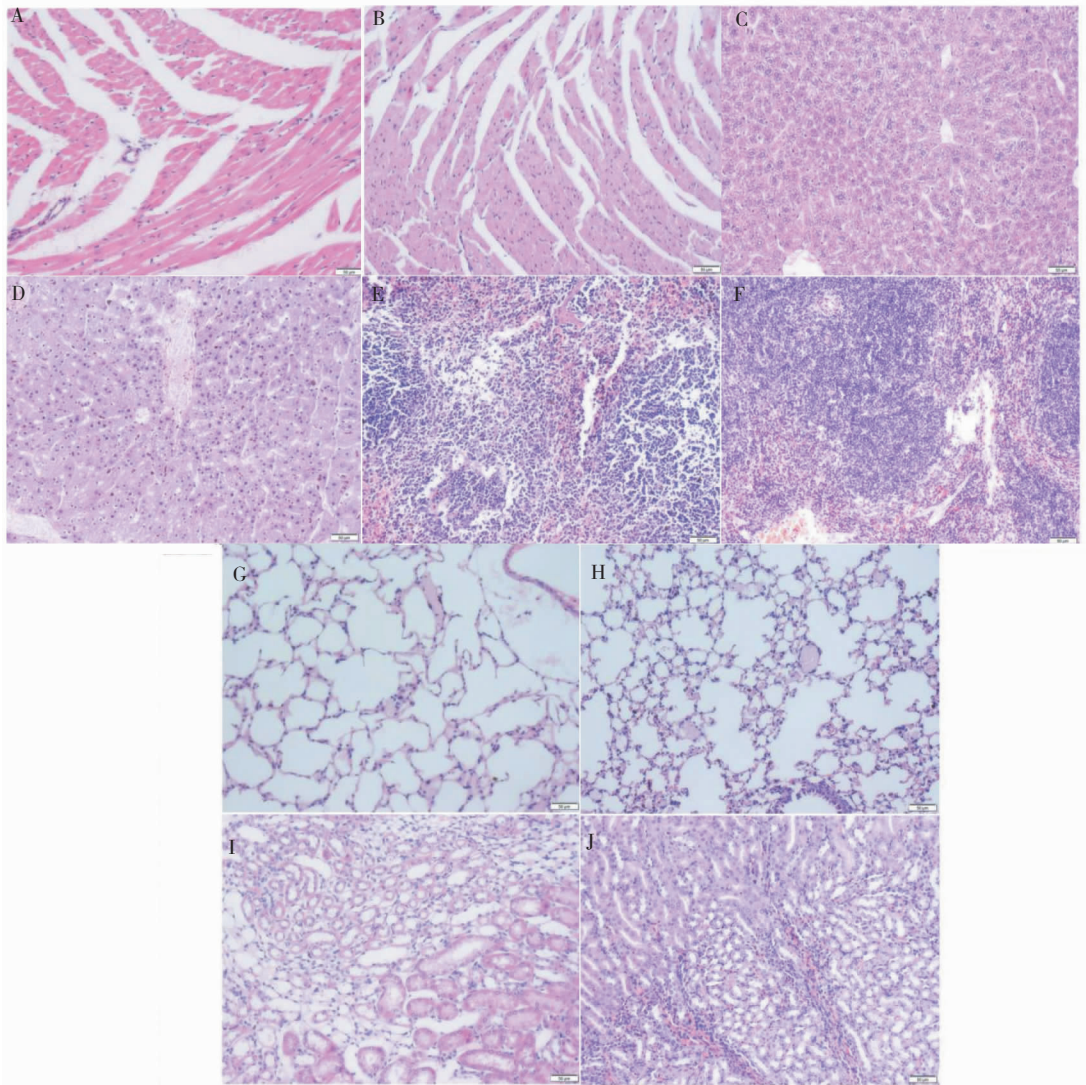


图1 小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏病理改变(HE染色,×200)

Fig. 1 Pathomorphological changes in mice heart, liver, spleen, lung and kidney(HE stain, ×200)

注:A、C、E、G、I为正常小鼠;B、D、F、H、J为死亡小鼠

Note: A, C, E, G, I: normal group, B, D, F, H, J: aloperin group

表3 小鼠体重观察表($\bar{x} \pm s$)Table 3 The weight of survival mice($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	性别 Sex	数目 Number	第一天 1 st day	第二天 2 nd day	第三天 3 rd day	第四天 4 th day	第五天 5 th day	第六天 6 th day	第七天 7 th day
空白 Normal	♂	6	19.95 ± 0.55	21.02 ± 0.55	22.44 ± 0.43	23.57 ± 0.19	24.78 ± 0.48	25.85 ± 0.50	26.48 ± 0.65
	♀	6	19.81 ± 0.44	20.66 ± 0.62	21.93 ± 0.67	22.55 ± 0.85	23.84 ± 0.64	24.80 ± 0.69	26.24 ± 0.41
1	♂	1	19.16 ± 0.37	19.32	20.43	23.42	22.45	25.03	26.12
	♀	2	20.38 ± 0.65	20.13 ± 0.81	21.64 ± 0.71	23.13 ± 0.81	24.34 ± 1.41	25.03 ± 1.00	25.69 ± 0.66
2	♂	2	20.01 ± 0.55	21.12 ± 0.11	22.02 ± 0.52	23.05 ± 0.71	24.80 ± 0.24	25.84 ± 0.19	27.44 ± 0.10
	♀	3	20.66 ± 0.41	22.82 ± 0.88	23.31 ± 0.46	24.26 ± 0.99	25.41 ± 0.78	26.62 ± 0.83	27.47 ± 0.52
3	♂	4	19.66 ± 0.22	20.79 ± 0.24	22.37 ± 0.44	24.35 ± 0.57	25.72 ± 0.48	26.97 ± 0.23	28.10 ± 0.40
	♀	3	21.23 ± 0.51	22.47 ± 1.22	22.78 ± 0.99	24.55 ± 1.11	25.45 ± 0.79	26.84 ± 0.71	26.90 ± 0.49
4	♂	4	20.56 ± 0.48	20.39 ± 2.30	23.99 ± 0.26	24.72 ± 0.46*	26.10 ± 0.62	27.52 ± 0.38*	28.43 ± 0.30
	♀	4	21.11 ± 0.42	22.01 ± 0.42	23.22 ± 0.41	24.05 ± 0.40	25.69 ± 0.29	25.95 ± 0.56	26.73 ± 0.23
5	♂	4	20.10 ± 0.44	21.12 ± 0.78	22.30 ± 0.43	23.18 ± 0.59	24.90 ± 0.88	25.91 ± 0.73	26.90 ± 0.74
	♀	5	20.55 ± 0.53	21.08 ± 0.63	22.17 ± 0.73	23.07 ± 0.46	24.11 ± 0.27	24.66 ± 0.35	25.66 ± 0.23

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control, * $P < 0.05$.

表4 小鼠体重增长观察表($\bar{x} \pm s$)Table 4 The increasing weight of survival mice($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	性别 Sex	数目 Number	第二天 2 nd day	第三天 3 rd day	第四天 4 th day	第五天 5 th day	第六天 6 th day	第七天 7 th day
空白 Normal	♂	6	1.06 ± 0.39	1.44 ± 0.20	1.132 ± 0.45	1.21 ± 0.40	1.07 ± 0.11	1.60 ± 0.37
	♀	6	0.85 ± 0.42	1.26 ± 0.14	0.62 ± 0.27	1.29 ± 0.33	0.96 ± 0.23	1.44 ± 0.38
1	♂	1	1.06	1.11	1.02	1.97	1.61	1.09
	♀	2	-0.03 ± 0.43	1.51 ± 0.10	1.495 ± 0.11	1.21 ± 0.60	0.70 ± 0.41	0.66 ± 0.35
2	♂	2	1.35 ± 0.22	0.81 ± 0.41	1.030 ± 0.19	1.75 ± 0.95	1.05 ± 0.05	1.60 ± 0.09
	♀	3	0.84 ± 0.79	1.23 ± 0.41	0.96 ± 0.53	0.88 ± 0.22	1.48 ± 0.05	0.85 ± 0.37
3	♂	4	0.93 ± 0.33	1.58 ± 0.34	1.978 ± 0.43	1.38 ± 0.11	1.24 ± 0.38	1.13 ± 0.19
	♀	3	1.57 ± 0.19	0.33 ± 0.37*	1.78 ± 0.78	0.90 ± 0.52	1.39 ± 0.28	0.06 ± 0.22*
4	♂	4	1.92 ± 0.07	1.11 ± 0.15	0.73 ± 0.29	1.38 ± 0.28	1.42 ± 0.27	0.91 ± 0.17
	♀	4	1.32 ± 0.44	1.15 ± 0.30	0.88 ± 0.26	1.64 ± 0.15	0.26 ± 0.47	0.78 ± 0.51
5	♂	4	1.65 ± 0.60	0.65 ± 0.61	1.11 ± 0.33	1.50 ± 0.29	1.02 ± 0.17	0.99 ± 0.06
	♀	5	0.54 ± 0.20	1.10 ± 0.33	0.89 ± 0.33	1.04 ± 0.22	0.55 ± 0.24	1.00 ± 0.19

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control, * $P < 0.05$.

苦豆子,有必要对其活性成分苦豆碱开展全面系统的研究。腹腔注射苦豆碱的急性毒性实验尚未有报道,故本实验希望就此问题开展研究并提供相关实验数据,将对进一步提升苦豆子的治疗价值起到积极作用。

在苦豆碱治疗神经性疼痛、哮喘等实验当中,采用的都是腹腔注射的给药方式,剂量从 20 mg/kg 到

80 mg/kg 不等,展现了良好的抗炎抗氧化效果^[7,8]。国内也早在 1985 年就对苦豆碱的药理作用展开研究^[9],但却并未对苦豆碱腹腔注射的急性毒性进行详尽的研究。腹腔注射操作方便,适宜多种大小动物给药,腹膜密布血管和淋巴管,具有吸收能力强,补液时间短、速度快等优点,探讨腹腔注射苦豆碱的急性毒性情况具有相当积极的意义。

首先,我们在观察实验动物的过程中,观察了体重的变化。体重可以反映动物中毒后的整体变化,引起体重改变的原因非常多,如化合物若对消化道有刺激或损伤,实验动物饮食会减少甚至拒食;若化合物引起腹泻,将影响食物吸收和利用,以上原因都会使实验动物体重减轻。如果化学毒物影响水的摄取或肾功能急性损伤,也可能在体重上反映出来。对受试动物的体重进行持续观察,可以了解受试物毒效应的持续时间。从实验每日体重对比以及每日体重增长表可以看出,苦豆碱对受试小鼠的整体体重以及体重增长基本没有影响。在第三组雌性小鼠中,第2、7天体重增长较空白组少,但是整体动物体重并无显著性差异。除去体重没有变化外,苦豆碱各给药组也没有出现饮食减少、拒食、腹泻等现象,说明苦豆碱并没有对受试小鼠的消化系统有损伤,也没有影响小鼠对水的摄取或造成肾功能的急性损伤。

其次,在小鼠苦豆碱腹腔注射给药后的一般情况中,给药各组小鼠开始出现不同程度的运动减少、阵挛性抽搐、腹式呼吸、四肢发绀、口分泌物过多、眼球突出等中毒反应,10 min后小鼠转为静卧、腹式呼吸、间歇性抽搐。在死亡之前的2 min,小鼠抽搐剧烈,随即死亡,死亡后眼球突出。600 mg/kg、480 mg/kg小鼠死亡前行走乏力,无法直立,有瘫痪的趋势,加之发生阵挛性及强直性抽搐,表明苦豆碱可能具有中枢神经毒性。

最后,在脏器观察中,肉眼可见心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏大都正常,但是病理结果提示,心脏、脾脏、肺脏、肾脏大致正常,符合肉眼观察结果,而肝脏出现较广泛区域的核固缩、凝聚等凋亡样改变,在HE染色下呈深蓝染,提示DNA停止转录。上述结果表明苦豆碱急性毒性的主要靶器官为肝脏。

综上所述,实验显示腹腔注射苦豆碱的半数致死量LD₅₀为395.62 mg/kg,并且在受试剂量下苦豆碱造成小鼠死亡的主要原因可能是中枢神经毒性和肝毒性,对小鼠的进食、心脏、脾脏、肺脏、肾脏无明显影响。

该研究为苦豆碱的进一步药理研究提供了实验基础。

参考文献

- 1 Jin SJ(金少举), Jin DX(金道欣), Wang WB(王文宝), et al. Study on the pharmacology of aloperine. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*(中药药理与临床), 2015, 31: 214-217.
- 2 Mou XL(牟新利), Wang WB(王武宝), Ba H(巴杭), et al. A review on the progress in the chemical compounds and pharmacology of *Sophora alopecuroides* L. *J Xinjiang Normal Univ*(新疆师范大学学报), 2005, 24: 46-50.
- 3 Zheng YX(郑堰心), Zhang L(张丽), Deng HZ(邓虹珠), et al. Effects of sophoridine, matrine and aloperine on the contents of cytokine IL-6 and TNF- α in LPS-induced IEC-6 cells inflammatory model. *Chin J Exp Tradit Med Formul*(中国实验方剂学杂志), 2014, 20: 133-136.
- 4 Yang ZW(杨志伟), Zhou Y(周娅), Cao XQ(曹秀琴). Effect of traditional Chinese medicine *Sophora alopecuroides* on CVB3 *in vitro*. *J Sichuan Tradit Chin Med*(四川中医), 2001, 21: 14-16.
- 5 Jiao HL(焦河玲), Yao R(姚锐), Deng HZ(邓虹珠), et al. Effect of total alkaloid of *Sophora alopecuroides* on SW480 cells and Balb/c nude mice tumor xenograft. *J Chin Med Mater*(中药材), 2011, 34: 1090-1093.
- 6 Technical Guidelines for the Acute Toxicity Studies of Chemicals Drafting Group(化学药物急性毒性研究技术指导原则编写组). Technical guidelines for the acute toxicity studies. GPT1-1, 2005.
- 7 Xu YQ, Jin SJ, Liu N, et al. Aloperine attenuated neuropathic pain induced by chronic constriction injury via anti-oxidation activity and suppression of the nuclear factor kappa B pathway. *Biochem Bioph Res Co*, 2014, 451: 568-573.
- 8 Li HL(李海龙), Luo QB(罗庆波), He JJ(何静江), et al. Effects of aloperine on pulmonary function, NF- κ B, TNF- α and IL-1 β in experimental asthmatic mice. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*(中药药理与临床), 2016, 32: 69-71.
- 9 Zhao DH(赵德化), Li ZN(李在那), Yang XM(杨晓敏), et al. Effects of aloperine on experimental arrhythmia. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*(中药药理与临床), 1985: 117.