

## 金雀花碱在山豆根肝毒性中的作用

樊海艇, 谷颖敏, 孙伟, 耿悦, 王莉萍, 金若敏, 张泽安, 田雪松\*  
(上海中医药大学, 上海 201203)

**[摘要]** **目的:**通过金雀花碱(CYT)体内和体外的肝毒性研究,探讨山豆根的肝毒性是否与CYT相关。**方法:**小鼠肝AML12细胞用于体外肝毒性研究,细胞增殖及细胞毒性检测(CCK-8)试剂盒检测细胞活性。分别加入终浓度为6,10,14 mmol·L<sup>-1</sup>的CYT,于加药后3,6,12,24 h,取细胞上清液,检测丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),总胆红素(TBIL)及乳酸脱氢酶(LDH)水平。急性毒性实验,小鼠分别单次口服灌胃24.8,33.1,44.2,58.9,78.5 mg·kg<sup>-1</sup> CYT,设空白组。亚慢性毒性实验,小鼠随机分为3组,分别口服灌胃超纯水,11.2,14.0 mg·kg<sup>-1</sup> CYT,连续90 d。第91天小鼠麻醉后取血清检测ALT,AST,TBIL,LDH等生化指标,并做肝脏病理切片。**结果:**CYT的半抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为15.17 mmol·L<sup>-1</sup>。14 mmol·L<sup>-1</sup> CYT自6 h起,ALT,AST释放逐渐增加,于12 h达到峰值( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),之后有下降趋势( $P < 0.01$ );14 mmol·L<sup>-1</sup> CYT早在给药6 h,LDH释放就已经显著升高( $P < 0.01$ ),在12 h达到顶峰( $P < 0.01$ ),在24 h有下降趋势( $P < 0.01$ );各浓度CYT在3,6,12,24 h时,较相应时间点空白组而言,TBIL释放均无显著性差异。在急性毒性实验,CYT的半数致死量(LD<sub>50</sub>)为48.16 mg·kg<sup>-1</sup>,属于全球化学品统一分类和标签制度(GHS)第2级。在亚慢性毒性实验,与空白组相比,CYT组小鼠血清ALT及LDH水平无明显差异;虽然CYT 14.0 mg·kg<sup>-1</sup>组小鼠血清TBIL含量升高( $P < 0.05$ ),AST含量下降( $P < 0.05$ ),但是均在本实验室背景数据范围内,与空白组相比,肝组织病理学切片亦无明显差异,这一结果可能与CYT 14.0 mg·kg<sup>-1</sup>组小鼠一半死亡,导致血液生化及肝脏病理标本量减少相关。**结论:**CYT属于GHS分类的经口急性毒性2级毒性物质,其在体外培养条件下具有肝细胞毒性,但是其在体内的肝毒性以及是否为山豆根肝毒性的毒性成分需要进一步研究。

**[关键词]** 金雀花碱;肝毒性;小鼠;AML12肝细胞

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)15-0176-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181526

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180516.1107.032.html>

**[网络出版时间]** 2018-05-16 16:35

### Effect of Cytisine on Hepatotoxicity of Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma

FAN Hai-ting, GU Ying-min, SUN Wei, GENG Yue, WANG Li-ping,  
JIN Ruo-min, ZHANG Ze-an, TIAN Xue-song\*

(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**[Abstract]** **Objective:** To preliminarily investigate whether the hepatotoxicity of Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma is associated with cytisine (CYT) by researching the hepatotoxicity of CYT *in vivo* and *in vitro*. **Method:** AML12 liver cells were cultured and employed as an *in vitro* model for hepatotoxicity. Cell viability of CYT was detected with a cell counting Kit-8 (CCK-8) assay. After various final concentrations of CYT (6, 10, 14 mmol·L<sup>-1</sup>) were added and treated for 3, 6, 12 and 24 h, the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBIL) and lactic dehydrogenase (LDH) in culture medium were measured. In the acute toxicity study, mice were administered with CYT by gavage at doses of 0, 24.8, 33.1,

**[收稿日期]** 20171109 (012)

**[基金项目]** 上海中医药大学预算内项目(2014YSN24);国家重点研发计划项目(2017YFC1702000)

**[第一作者]** 樊海艇,助理实验师,从事中药毒理学研究,Tel:021-51322649,E-mail:fanhaiting2575@163.com

**[通信作者]** \*田雪松,博士,研究员,从事中医毒理及药物安全性评价研究,Tel:021-51322401,E-mail:xuesong.tian@shutcm.edu.cn

44.2, 58.9, 78.5 mg·kg<sup>-1</sup>, respectively. In the sub-chronic toxicity study, male mice were divided into three groups and orally treated with ultrapure water (11.2 mg·kg<sup>-1</sup> CYT and 14.0 mg·kg<sup>-1</sup> CYT) for 90 days. At the end of administration, the mice were anaesthetized for collecting serum and testing biochemical indicators, including ALT, AST, TBIL, LDH. **Result:** The half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) value of CYT was the 15.17 mmol·L<sup>-1</sup>. Since the treatment with 14 mmol·L<sup>-1</sup> for 6 h, LDH release robustly increased, peaked at 12 h ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and declined at 24 h ( $P < 0.01$ ). Furthermore, in cells treated with 14 mmol·L<sup>-1</sup> CYT, the levels of LDH started to significantly increase at 6 h at the earliest ( $P < 0.01$ ), peaked at 12 h ( $P < 0.01$ ), and declined thereafter ( $P < 0.01$ ). However, 6, 10, 14 mmol·L<sup>-1</sup> CYT were found to have no effect on TBIL release. In the acute toxicity, median lethal dose (LD<sub>50</sub>) of CYT was 48.16 mg·kg<sup>-1</sup> and belonged to grade 2 in the globally harmonized system of classification and labeling of chemicals (GSH). In the sub-chronic toxicity, compared with the blank control group, no significant change in ALT and LDH levels was observed in CYT treated mice. Although animals treated with 14.0 mg·kg<sup>-1</sup> CYT showed lower AST ( $P < 0.05$ ) and higher TBIL ( $P < 0.05$ ), these findings were unable to be correlated with the changes of enzyme activities induced by liver injury, since these parameters were within the background data range of our laboratory. There were no significant change in histopathological examination compared with control and CYT treated mice in the liver. This results may be related to the facts that half of the mice died in 14.0 mg·kg<sup>-1</sup> CYT treated group, which led to a decrease in the samples of biochemistry and hepatic histopathological examination. **Conclusion:** CYT belongs to the grade 2 toxic substance of GSH in oral acute toxicity. It has hepatocyte toxicity *in vitro*, but the hepatotoxicity *in vivo* and whether belonging to the hepatotoxic ingredient of radix *Sophorae tonkinensis* still needs to be further studied.

[**Key words**] cytisine; hepatotoxicity; mice; AML12 liver cells

山豆根用于治疗火毒蕴结所致之咽喉、齿龈肿痛,苦参碱、氧化苦参碱为其主要生物碱成分,并且含量作为山豆根药材的质量控制指标<sup>[1]</sup>。此外,山豆根还含有毒性在静脉注射时远高于苦参碱和氧化苦参碱的金雀花碱(CYT)<sup>[2-4]</sup>,CYT自豆科植物金莲花 *Laburnum anagyroides* 种子提纯、分离,作为一种部分激动剂,选择性地结合  $\alpha_4\beta_2$ -nAChRs 受体来缓解尼古丁依赖,在东欧地区广泛用于戒烟治疗<sup>[5-7]</sup>。古代本草文献中未记载山豆根有毒,近年来随着山豆根在临床上的广泛应用,医学文献中关于山豆根中毒的报道逐渐增多。1976年天津市药检所首次报道了山豆根的临床毒性,并通过动物实验确认;1980年编印的《广西民族药简编》中首次录入山豆根有毒,谓其“有小毒”;1985年版及以后的《中国药典》明确记载:“山豆根,苦,寒,有毒”<sup>[1]</sup>。针对山豆根毒效并存的现状,对山豆根进行毒性物质基础研究尤为重要。文献报道,山豆根不同提取部位可诱发斑马鱼肝脏及心血管毒性<sup>[8]</sup>。本中心前期研究亦表明,山豆根水提浸膏粉具有肝毒性<sup>[2]</sup>,且与苦参碱和氧化苦参碱相关<sup>[9-11]</sup>。但是,山豆根的肝毒性是否与CYT相关,鲜见文献报道。故本实验在前期工作的基础上进行CYT的体内、体外的毒性研究,探讨CYT是否为山豆根肝毒性的毒性

成分。

## 1 材料

**1.1 药物** CYT(上海融禾医药科技发展有限公司,批号160920,纯度 $\geq 98\%$ )。

**1.2 试剂** DMEM/F-12培养基,胎牛血清,青-链霉素(Gibco公司,批号分别为1785916,1804958,1881450);胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸钠(ITS)试剂,地塞米松(Sigma公司,批号分别为SLBV2435, WXBC0965V);细胞增殖及细胞毒性检测(CCK-8)试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号C0039);天门冬氨酸氨基转移酶(AST),丙氨酸氨基转移酶(ALT),乳酸脱氢酶(LDH)试剂(日本世诺临床诊断制品株式会社,批号分别为R1:G767, R2:D761; R1:F768, R2:F762; R1:I659, R2:K554);总胆红素(TBIL)试剂(日本和光纯药工业株式会社,批号R1:TR364, R2:TR362);异氟烷(河北一品制药股份有限公司,批号130302)。

**1.3 仪器** 3111型CO<sub>2</sub>细胞培养箱(美国Thermo公司),Synergy2型多功能酶标仪(美国Bio-Tek公司),日立7080型全自动生化分析仪(日本日立株式会社),HMS70型全自动染色机(德国Microm公司),LS-113大型滑走式轮式切片机(日本大和光机工业株式会社),BX43型光学显微镜(日本奥林巴

斯株式会社)。

**1.4 动物** SPF级ICR小鼠,雌、雄各半,体质量18~22 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号SCXK(沪)2017-0005。雄性SPF级C57BL/6小鼠,18~22 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号SCXK(沪)2012-0002。动物实验方案经上海中医药大学实验动物伦理委员会审查批准,编号SZY201504021。

## 2 方法

**2.1 AML12细胞体外培养** 小鼠肝AML12细胞由上海中医药大学附属曙光医院冯琴教授惠赠。用含10%胎牛血清的DMEM/F12,1%青-链霉素,地塞米松( $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )及ITS( $10 \text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ )的培养基在 $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$ 且饱和湿度条件下进行常规培养,3 d传代1次,取对数期细胞进行实验。

**2.2 CCK-8法检测细胞毒性** 取处于对数生长期的AML12细胞均匀接种于96孔板中,每孔加入细胞混悬液 $100 \mu\text{L}$ ,5 000~6 000个细胞/孔。置于 $\text{CO}_2$ 细胞培养箱中培养24 h后,加入梯度浓度的CYT,每组设6个平行孔,再培养24 h后,每孔加入CCK-8溶液 $10 \mu\text{L}$ ,放入细胞培养箱中孵育2 h,用酶标仪在450 nm波长处检测各孔的吸光度 $A$ 。根据 $A$ 计算细胞活性,细胞抑制率 $= (A_s - A_b) / (A_c - A_b) \times 100\%$ , $A_s$ 为CYT组(细胞+培养基+CCK-8+CYT浓度分别为10,14,18,22,26,30  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), $A_b$ 为空白组(培养基+CCK-8), $A_c$ 为空白组(细胞+培养基+CCK-8)。

**2.3 细胞内ALT,AST,TBIL及LDH释放检测** 取处于对数生长期的AML12细胞均匀接种于96孔板中,每孔加入细胞混悬液 $200 \mu\text{L}$ ,5 000~6 000个细胞/孔。在 $\text{CO}_2$ 细胞培养箱中培养24 h后,分别加入终浓度分别为6,10,14  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  CYT,同时设有空白组,每组设5个平行孔。加药后,置于 $\text{CO}_2$ 细胞培养箱中进行培养,并且分别于加药后3,6,12,24 h,取细胞上清液,用全自动生化分析仪检测ALT,AST,TBIL,LDH水平。

**2.4 急性毒性实验动物及分组** 实验期间小鼠饲养于SPF级动物饲养室,环境温度 $22\sim 24^\circ\text{C}$ ,相对湿度54%~66%,换气次数15次/h,12 h/12 h明/暗,标准饮食饮水。所有实验方案均符合上海中医药大学IACUC的要求。60只ICR小鼠随机分为6组,每组10只,雌雄各半。CYT最高剂量为 $78.5 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,组距比率为0.75,逐级递减浓度,最低(第6组)剂量为 $24.8 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

**2.5 急性毒性症状的观察和死亡率的计算** 参照《化学药物急性毒性研究技术指导原则》<sup>[12]</sup>,CYT给药后4 h内严密观察,以后每天观察小鼠的行为活动、饮食和饮水等,连续观察14 d,并计算半数致死量( $\text{LD}_{50}$ )。

**2.6 亚慢性毒性实验动物及分组** 动物饲养及处理同2.4项。24只C57BL/6小鼠随机分为3组:空白组,CYT 11.2,14.0  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组,每组8只,灌胃给药,连续90 d,空白组给予超纯水灌胃。

**2.7 亚慢性毒性实验血清生化指标检测** 第91天,采血前C57BL/6小鼠禁食不禁水4 h,异氟烷吸入麻醉,腹腔静脉采血,3 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min后取血清,全自动生化分析仪检测ALT,AST,TBIL和LDH活性。

**2.8 苏木素-伊红(HE)染色检测肝组织病理变化** 采血后取肝,于10%甲醛溶液固定2周,经乙醇梯度脱水,二甲苯透明后,常规石蜡包埋,切片厚 $4 \mu\text{m}$ ,HE染色,制作好的切片在光镜下观察肝组织病理变化。

**2.9 统计学分析** 所有数据均采用SPSS 13.0软件统计,所有计量数据均使用 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料比较采用方差分析,若方差齐则进行单因素方差分析;若方差不齐则进行非参数检验(Kruskal-Wallis检验),如K-W检验有统计学差异( $P < 0.05$ ),则各剂量组与空白组间做Mann-Whitney U检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。采用Probit概率单位加权回归法计算CYT对ICR小鼠的 $\text{LD}_{50}$ 及可信区间。

## 3 结果

**3.1 CYT对AML12肝细胞活性的影响** 分别给予10,14,18,22,26,30  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的CYT 24 h,AML12细胞的抑制率分别为 $(78.82 \pm 0.91)\%$ , $(61.34 \pm 0.99)\%$ , $(31.31 \pm 0.33)\%$ , $(22.87 \pm 0.49)\%$ , $(12.49 \pm 0.33)\%$ , $(9.72 \pm 0.10)\%$ 。表明CYT体外对AML12细胞存活具有抑制作用,随CYT浓度的升高,细胞存活下降, $\text{IC}_{50}$ 为 $15.17 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**3.2 CYT对AML12肝细胞ALT,AST,TBIL及LDH释放的影响** 与空白组相比,14  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  CYT组自6 h起,ALT,AST释放逐渐增加,于12 h达到峰值( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),在24 h有下降趋势( $P < 0.01$ ),6,10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  CYT组未见明显影响。见表1,2。14  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  CYT组早在6 h时,LDH释放显著高于对应时间点的空白组( $P < 0.01$ ),在12 h达到顶峰( $P < 0.01$ ),在24 h有下降趋势( $P < 0.01$ ),

6, 10 mmol·L<sup>-1</sup> CYT 组未见明显影响。见表 3。各浓度 CYT 组在 3, 6, 12, 24 h 时, 与对应时间点的空白组比较, TBIL 释放均无显著性差异。见表 4。

表 1 CYT 对 AML12 肝细胞 ALT 释放的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 1 Effect of CYT on ALT leakage in culture medium in AML12 liver cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ ) U·L<sup>-1</sup>

组别	浓度 /mmol·L <sup>-1</sup>	3 h	6 h	12 h	24 h
空白	-	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
CYT	6	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
	10	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
	14	1.00 ± 0.00	1.40 ± 0.55	2.40 ± 0.89 <sup>1)</sup>	2.40 ± 0.55 <sup>2)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

表 2 CYT 对 AML12 肝细胞 AST 释放的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Effect of CYT on AST leakage in culture medium in AML12 liver cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ ) U·L<sup>-1</sup>

组别	浓度 /mmol·L <sup>-1</sup>	3 h	6 h	12 h	24 h
空白	-	1.80 ± 0.45	1.60 ± 0.55	1.60 ± 0.55	1.00 ± 0.00
CYT	6	1.40 ± 0.55	2.00 ± 0.00	1.60 ± 0.89	1.20 ± 0.45
	10	2.00 ± 0.00	1.80 ± 0.45	1.80 ± 0.45	1.40 ± 0.55
	14	1.60 ± 0.55	2.80 ± 0.84	5.40 ± 1.82 <sup>1)</sup>	4.60 ± 1.14 <sup>1)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$  (表 3 同)。

表 3 CYT 对 AML12 肝细胞 LDH 释放的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 Effect of CYT on LDH leakage in culture medium in AML12 liver cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ ) U·L<sup>-1</sup>

组别	浓度 /mmol·L <sup>-1</sup>	3 h	6 h	12 h	24 h
空白	-	9.40 ± 1.14	9.20 ± 0.45	11.20 ± 2.17	1.20 ± 1.10
CYT	6	9.20 ± 1.30	9.80 ± 1.64	12.60 ± 4.77	11.20 ± 0.84
	10	9.40 ± 0.89	10.60 ± 0.89	13.00 ± 3.74	11.80 ± 0.45
	14	10.40 ± 0.55	14.40 ± 2.51 <sup>1)</sup>	30.40 ± 11.55 <sup>1)</sup>	22.60 ± 3.65 <sup>1)</sup>

表 4 CYT 对 AML12 肝细胞 TBIL 释放的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 4 Effect of CYT on TBIL leakage in culture medium in AML12 liver cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ ) μmol·L<sup>-1</sup>

组别	浓度 /mmol·L <sup>-1</sup>	3 h	6 h	12 h	24 h
空白	-	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.05	0.17 ± 0.04	0.21 ± 0.02
CYT	6	0.17 ± 0.04	0.19 ± 0.04	0.16 ± 0.03	0.22 ± 0.02
	10	0.17 ± 0.03	0.18 ± 0.05	0.17 ± 0.03	0.21 ± 0.02
	14	0.17 ± 0.06	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.04

### 3.3 CYT 对小鼠急性毒性症状及死亡率的影响

给予 CYT 后 5 ~ 10 min, 与空白组相比, 随着剂量的增加, 小鼠即出现活动减弱、闭目、蜷缩、呼吸加快、浑身震颤、痉挛、呼吸困难, 乃至死亡, 存活小鼠在 1 h 后缓慢恢复状态。根据动物死亡情况, 经 Probit 法计算, CYT 的经口灌胃 LD<sub>50</sub> 及其 95% 可信区间为 48.16 mg·kg<sup>-1</sup> (40.55 ~ 58.62 mg·kg<sup>-1</sup>)。见表 5。

表 5 小鼠口服 CYT 急性毒性

Table 5 Acute oral toxicity of CYT in mice

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	死亡数/总数
空白	-	0/10
CYT	24.8	0/10
	33.1	3/10
	44.2	4/10
	58.9	5/10
	78.5	10/10

### 3.4 CYT 对亚慢性毒性实验小鼠血清生化指标及肝组织病理变化的影响

CYT 14.0 mg·kg<sup>-1</sup> 组小鼠, 随给药时间延长, 逐渐死亡, 至 91 d 解剖时剩余 4 只。与空白组相比, CYT 11.2, 14.0 mg·kg<sup>-1</sup> 组小鼠血清 ALT, LDH 水平无明显差异; 虽然 14.0 mg·kg<sup>-1</sup> 组小鼠血清 TBIL 含量升高 ( $P < 0.05$ ), AST 含量下降 ( $P < 0.05$ ), 但是均在本实验室背景数据范围内, 故不认为 CYT 对血清生化指标有显著影响, 不具有临床意义。这一结果可能与 14.0 mg·kg<sup>-1</sup> 组动物一半死亡, 导致血液生化及肝脏病理标本量减少相关。见表 6。

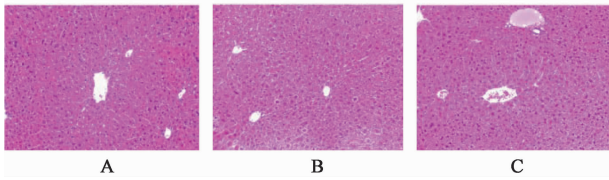
表 6 CYT 灌胃 90 d 对小鼠血清生化指标的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 6 Effect of 90-day treatment with CYT on biochemistry changes in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	ALT /U·L <sup>-1</sup>	AST /U·L <sup>-1</sup>	LDH /U·L <sup>-1</sup>	TBIL /μmol·L <sup>-1</sup>
空白	-	19.29 ± 3.95	36.29 ± 7.70	159.14 ± 33.63	1.08 ± 0.25
CYT	11.2	19.75 ± 1.98	36.63 ± 2.88	159.00 ± 6.99	1.09 ± 0.07
	14.0	16.25 ± 1.71	27.25 ± 2.63 <sup>1)</sup>	152.50 ± 18.52	1.39 ± 0.27 <sup>1)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

给药组和空白组小鼠解剖后肉眼观察皮下、心、肝、脾、肺、肾和胃肠道等器官无明显肉眼异常变化。肝脏 HE 染色结果显示, 与空白组相比, 亦无明显变化。见图 1。



A. 空白组; B. CYT 11.2 mg·kg<sup>-1</sup>组; C. CYT 14.0 mg·kg<sup>-1</sup>组

图 1 CYT 灌胃 90 d 对小鼠肝组织的影响(HE, × 200)

Fig 1 Effect of 90-day intragastric administration with CYT on hepatic tissue in mice (HE, × 200)

#### 4 讨论

CYT 目前被认为是一种有效且价廉的戒烟药,其戒烟机制类似伐尼克兰<sup>[7]</sup>,也有文献报道 CYT 能够缓解不可预见的慢性轻度精神压力引起的小鼠抑郁样行为<sup>[13]</sup>,能够通过下调 NMDA 受体 GluN2B 亚单位拮抗兴奋性神经毒性,从而具有神经元保护作用<sup>[6]</sup>。

本课题组前期研究表明山豆根中含有 CYT,但是其含量少于苦参碱和氧化苦参碱<sup>[2]</sup>。文献报道小鼠静脉注射 CYT 的 LD<sub>50</sub> 为 1.52 mg·kg<sup>-1</sup><sup>[3]</sup>,而静脉注射苦参碱、氧化苦参碱的 LD<sub>50</sub> 分别为 83.21, 214.22 mg·kg<sup>-1</sup><sup>[14]</sup>,表明静脉注射时 CYT 的毒性远高于苦参碱和氧化苦参碱。但是灌胃口服 CYT 的 LD<sub>50</sub>,迄今为止鲜有文献报道。本次急性毒性实验,小鼠灌胃 CYT 的 LD<sub>50</sub> 为 48.16 mg·kg<sup>-1</sup>,按照全球化学品统一分类和标签制度(GSH)的关于化学品急性毒性分级标准属于经口急性毒性第 2 级(5 < LD<sub>50</sub> ≤ 50),与文献报道的小鼠灌胃苦参碱、氧化苦参碱的 LD<sub>50</sub> 分别为 64.01, 85.95 mg·kg<sup>-1</sup><sup>[15-16]</sup> 相比,口服灌胃时 CYT 毒性亦高于苦参碱和氧化苦参碱。

ALT, AST 及 LDH 等酶含量可作为肝细胞损伤和肝功能失调的标志,离体状态下的肝细胞损伤,可以通过检测释放到培养液中的 ALT, AST 及 LDH 含量来直接确定<sup>[17]</sup>。本研究通过体外实验发现, CYT 对小鼠肝 AML12 细胞有损伤作用, IC<sub>50</sub> 为 15.17 mmol·L<sup>-1</sup>, 在此浓度的基础上, 选用 6, 10, 14 mmol·L<sup>-1</sup> 的 CYT, 分别于加药后 3, 6, 12, 24 h 检测上清液, 结果表明, 14 mmol·L<sup>-1</sup> 的 CYT 可显著增加上述 3 种酶在细胞培养液中的含量, 表明高浓度的 CYT 导致细胞膜损伤, 具有一定的肝细胞毒性。此外, 各剂量组在各时间点对 TBIL 释放量无明显影响, 可能与细胞培养条件下缺乏 TBIL 生成的主要原料, 即衰老红细胞释放的血红蛋白相关。

为了进一步验证体外实验的结果, 本研究采用连续给药 90 d 的小鼠亚慢性毒性实验来探讨 CYT

的肝毒性。在毒理学实验中, 通常根据急性毒性实验结果来选择长期毒性实验给药剂量。本次实验以 LD<sub>50</sub> 的约 1/3 剂量 14.0 mg·kg<sup>-1</sup> 作为亚慢性毒性实验高剂量, 高剂量的 0.8 倍 11.2 mg·kg<sup>-1</sup> 为低剂量。结果显示, 在小鼠生存方面, 高剂量组小鼠随给药时间延长而逐渐死亡, 至解剖时剩余 4 只, 低剂量组全部存活; 在血清生化指标方面, AST, TBIL 改变均无临床意义; 在病理学方面亦无肝毒性病理改变。这一结果可能与 14.0 mg·kg<sup>-1</sup> 组动物一半死亡, 导致血液生化及肝脏病理标本量减少相关。文献报道, CYT 具有潜在肝毒性, 连续 90 d 给予 1.35 mg·kg<sup>-1</sup> 的 CYT, 可导致血清 ALT 2 倍升高, 但是 AST 和碱性磷酸酶无明显改变<sup>[18]</sup>。也有文献报道, 大鼠连续 14 d 口服灌胃 5 mg·kg<sup>-1</sup> 的 CYT 对血清 ALT, AST 无明显影响<sup>[5]</sup>。此外, 文献报道, 与尼古丁相比金雀花碱在丙二醛实验中的高毒性的可能解释是, 金雀花碱在肝脏内不进行生物转化, 有 90% ~ 95% 以原型从尿排泄<sup>[18]</sup>。因此, CYT 在体内的肝毒性以及是否为山豆根肝毒性的毒性成分需要进一步研究。

综上所述, 本研究结果表明, CYT 属于 GSH 分类的经口急性毒性 2 级毒性物质, 其在体外培养条件下具有肝细胞毒性, 但是体内的肝毒性以及是否为山豆根肝毒性的毒性成分仍需进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 田雪松. 山豆根中生物碱的毒性研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(6): 230-234.
- [2] WANG L P, LU J Y, SUN W, et al. Hepatotoxicity induced by radix Sophorae tonkinensis in mice and increased serum cholinesterase as a potential supplemental biomarker for liver injury [J]. *Exper Toxicol Pathol*, 2017, 69(4): 193-202.
- [3] 钱利武, 戴五好, 周国勤, 等. 金雀花型生物碱对小鼠的急性毒性研究 [J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(9): 2158-2160.
- [4] 韩馥蔓, 王莉鑫, 陈影, 等. HPLC 同时测定山豆根中 7 种生物碱及 3 种黄酮的含量 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(24): 4628-4634.
- [5] Simeonova R, Vitcheva V, Mitcheva M. Effect of cytosine on some brain and hepatic biochemical parameters in spontaneously hypertensive rats [J]. *Toxicol Lett*, 2014, 229(1): 21-25.
- [6] LI Y J, YANG Q, ZHANG K, et al. Cytosine confers neuronal protection against excitotoxic injury by down-regulating GluN2B-containing NMDA receptors [J]. *Neurotoxicology*, 2013, 34(1): 219-225.

- [ 7 ] Cahill K, Stevens S, Perera R, et al. *Pharmacological interventions for smoking cessation: an overview and network Meta-analysis* [ M ]. New York: John Wiley & Sons, Ltd, 2011: CD009329.
- [ 8 ] LIU H C, ZHU X Y, CHEN J H, et al. Toxicity comparison of different active fractions extracted from radix Sophorae tonkinensis in zebrafish [ J ]. *Biomed Biotechnol*, 2017, 18(9): 757-769.
- [ 9 ] 张茜, 李峰杰, 金若敏, 等. 苦参碱和氧化苦参碱致 HL7702 细胞毒性研究 [ J ]. *中华中医药学刊*, 2011, 29(6): 1222-1225.
- [ 10 ] 郭秋平, 金若敏. 苦参碱和氧化苦参碱致小鼠肝毒性比较 [ J ]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2016, 30(7): 736-740.
- [ 11 ] 杨鹏, 张松, 郭舜, 等. 苦参碱抑制 Akt 信号通路诱导结肠癌 SW480 细胞凋亡 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(7): 109-113.
- [ 12 ] 《化学药物急性毒性试验技术指导原则》课题研究组. *化学药物急性毒性试验技术指导原则* [ M ]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 1-18.
- [ 13 ] HAN J, WANG D, LIU S, et al. Cytisine, a partial agonist of  $\alpha_4\beta_2$  nicotinic acetylcholine receptors, reduced unpredictable chronic mild stress-induced depression-like behaviors [ J ]. *Biomol Ther*, 2016, 24(3): 291-297.
- [ 14 ] 戴五好, 钱利武, 王丽丽, 等. 苦参碱、氧化苦参碱对小鼠的毒性研究 [ J ]. *安徽医药*, 2012, 16(7): 904-905.
- [ 15 ] 张宏利, 杨清娥, 杨学军, 等. 苦参碱的提取分离及对小鼠的毒性研究 [ J ]. *西北植物学报*, 2005, 25(8): 1649-1652.
- [ 16 ] 张宏利, 贺春玲, 杨清娥, 等. 氧化苦参碱的提取分离及对小鼠的毒性研究 [ J ]. *天然产物研究与开发*, 2006, 18(2): 279-281, 272.
- [ 17 ] SHI C, CHEN X, LIU Z, et al. Oleuropein protects L-02 cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress by increasing SOD1, GPx1 and CAT expression [ J ]. *Biomed Pharm*, 2017, doi: 10.1016/j.biopha.2016.11.092.
- [ 18 ] Tutka P, Zatonski W. Cytisine for the treatment of nicotine addiction: from a molecule to therapeutic efficacy [ J ]. *Pharmacol Rep*, 2007, 58(6): 777-798.

[ 责任编辑 张丰丰 ]