

雷公藤片对迟发型超敏反应小鼠的 药效与肝脏伴随毒副作用研究

赵庆华^{1,2}, 孙蓉^{2*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东省中医药研究院, 济南 250014)

[摘要] **目的:**研究雷公藤片发挥抗炎作用剂量下伴随的肝毒性作用,为其“病-效-毒”相关性研究提供理论依据。**方法:**80只KM小鼠,全部雄鼠,随机分为8组,每组10只,分别为正常组、模型组、雷公藤片剂量1~5组(51.48, 36.55, 25.74, 18.28, 12.87 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和环磷酰胺组(73 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),除正常组外,其余各组均以1% 2,4-二硝基氟苯(DNFB)溶液建立小鼠迟发型超敏反应模型,通过给予不同剂量的雷公藤片,观察小鼠的耳肿胀度和肿胀抑制率,检测血清中前列腺素 E_2 (PGE_2),肿瘤坏死因子- α ($\text{TNF-}\alpha$),白细胞介素-2(IL-2),前白蛋白(PA),丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),总胆汁酸(TBA)和总胆红素(TBIL)等生化指标水平的变化,并计算脏器和体重的比值。**结果:**与正常组比较,模型组小鼠耳肿胀血清中 PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$, IL-2, PA含量明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,雷公藤片可明显抑制迟发型超敏反应致小鼠耳肿胀血清中 PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$ 和IL-2含量的降低,并呈现一定的剂量依赖性;小鼠血中ALT, AST, TBA, TBIL活性升高, PA含量降低,肝体比值变大($P < 0.01$)。**结论:**雷公藤片在14.58 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (7.01~19.06 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)有较强的抗炎作用,其抗炎机制与减少炎性介质的产生和释放有关。剂量14.58 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (7.01~19.06 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)的雷公藤片还可对小鼠肝脏产生一定的损伤。

[关键词] 雷公藤片; 迟发型超敏反应; 功效; 毒性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)03-0156-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016030156

Toxic and Side Effects of Leigongteng Tablet in Mice with Delayed Type Hypersensitivity

ZHAO Qing-hua^{1,2}, SUN Rong^{2*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250355, China;

2. Shandong Research Academy of TCM, Ji'nan 250014, China)

[Abstract] **Objective:** To study the accompanied hepatotoxicity effect of Leigongteng tablet under anti-inflammation dose, and provide theory basis for ‘disease-efficacy-toxicity’ correlation research. **Method:** The 80 male KM mice were randomly divided into 8 groups, in each group, including normal group, model group, 5 Leigongteng tablet groups (51.48, 36.55, 25.74, 18.28, 12.87 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and cyclophosphamide group (73 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). All other groups except normal group received 1% 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) solution to establish delayed type hypersensitivity models. Leigongteng tablets of different doses were given to observe the ear swelling degree and the inhibition ratio. The levels of prostaglandin E_2 (PGE_2), tumour necrosis factor α ($\text{TNF-}\alpha$), interleukin-2 (IL-2), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), prealbumin (PA), total bile acid (TBA), total bilirubin (TBIL) in serum were detected while the ratios of organs to body weight were measured. **Result:** Compared with the normal group, the mice in model group had ear swelling, and the levels of PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$, IL-2 and PA in serum were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, Leigongteng tablet could significant inhibit ear swelling and the levels of PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$, and IL-2 were decreased in a dose dependent manner; the activities of serum ALT, AST, TBA and TBIL were increased; PA content was decreased; and the ratio of liver to body was increased. **Conclusion:**

[收稿日期] 20150103(002)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2009CB522802)

[第一作者] 赵庆华, 硕士, 中药药理与毒理研究, Tel:13791056551, E-mail:13791056551@163.com

[通讯作者] * 孙蓉, 博士, 博士生导师, 研究员, 中药药理与毒理研究, Tel:0531-82949843, E-mail:sunrong107@163.com

Leigongteng tablet has strong anti-inflammatory effects under the dose of $14.58 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($7.01\text{--}19.06 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$). The mechanism is related to the generation and decrease of inflammatory medium release. Toxicity and side effects of different degree can be caused to liver by administration of Leigongteng tablet at the same dosage.

[Key words] Leigongteng tablet; delayed-type hypersensitivity; efficacy; toxicity

雷公藤片是由雷公藤提取物制成的片剂,具有抗炎和免疫抑制作用,主要用于治疗类风湿性关节炎、肾病综合征、巩膜炎、子宫内膜炎;亦可用于斑秃、荨麻疹等^[1-2],是一种疗效肯定的免疫抑制中药。随着研究的不断深入,雷公藤片的应用日益广泛、成熟,涉及临床各科,取得了满意疗效。雷公藤甲素是雷公藤片的主要成分,其对小鼠淋巴细胞体外活化具有抑制作用,对动物非特异性免疫、特异性免疫功能均有影响^[3]。雷公藤片的副作用以消化道最为多见,肝脏是最为常见的受累器官,主要表现为转氨酶、总胆红素水平升高^[4-5]。基于以上研究,用 2,4-二硝基氟苯(2,4-dinitrofluorobenzene, DNFB)造成小鼠迟发型超敏反应(delayed-type hypersensitivity, DTH)模型,观察雷公藤片的抗免疫炎症作用和以及可能出现的毒副作用,为雷公藤片“病-效-毒”关联性评价提供剂量变化依据,为药品不良反应的预警方案和早期诊疗措施提供参考。

1 材料

1.1 动物 KM 小鼠,全部雄性,体重 18~22 g,购自山东大学实验动物中心,动物合格证号 SCXK(鲁)20130001。实验动物配合饲料(鼠),合格证号 SCXK(鲁)2013-0014。

1.2 药物及试剂 雷公藤片样品的制备:取雷公藤片,去除包衣,研成粉末,配制成含雷公藤甲素 $8.24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水溶液。装瓶置冰箱中备用,临用时加蒸馏水稀释至所需浓度。本品购自黄石三九药业有限公司,批号 1107212Z,每片含雷公藤甲素 33 μg ,成人最多每天 6 片。环磷酰胺片制备:将药物除去糖包衣,用研钵研成粉末,用蒸馏水稀释至所需浓度。本品购自通化茂祥制药有限公司,批号 2013306,70 kg 成人日用量最高为 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。1% DNFB 溶液:称取 DNFB 50 mg,置清洁干燥的青霉素小瓶中,将预先配置好的 5 mL 丙酮油溶液[(丙酮-麻油(1:1))],倒入小瓶,密封,混匀。丙氨酸氨基转移酶(ALT,批号 20130425),天门冬氨酸氨基转移酶(AST,批号 20130107),总胆红素(TBI,批号 20130527),前白蛋白(PA,批号 20130509),总胆汁酸(TBA,批号 20130604),肿瘤坏死因子- α (TNF- α ,批号 20130603),白细胞介素-2(IL-2,批号

20130518)等试剂盒均购自南京建成生物科技有限公司。

1.3 仪器 MS303TS 型电子天平(梅特勒-托利多有限公司),DDL-5 型型低速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),DZKM-S-6 型电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂),UV-2102 型紫外分光光度仪(尤尼柯有限公司),Multiskan Go-1510 型全波长酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 取雄性小鼠 80 只,随机分为 8 组,每组 10 只,分别为正常组、模型组、雷公藤片剂量 1~5 组和环磷酰胺阳性药组。以雷公藤片 70 kg 人临床用量等效剂量的一半和 2 倍量分别为最小和最大剂量,设置雷公藤片抗免疫炎症 ED_{50} 实验剂量分别为 51.48,36.55,25.74,18.28,12.87 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。根据 ED_{50} 结果为 51.48 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 效应率已达 100%,故雷公藤片对迟发型超敏反应小鼠伴随毒副作用实验的高、中、低剂量组分别设置为 51.48,36.55,25.74 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。正常组按上面等体积的蒸馏水灌胃;阳性药环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)人日用量最高为 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,折合成小鼠用量剂量为 $73 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。造模后连续灌服各受试药物,正常组和模型组每日灌服等量的蒸馏水。

2.2 小鼠抗迟发型超敏反应试验模型建立 除正常组外,每只小鼠腹部去毛,约为 $3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$,并将 1% DNFB 丙酮麻油溶液 50 μL 均匀涂抹致敏,必要时于第 2 天再强化 1 次,按 $25 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体积连续 *ig* 给药 5 d,正常组给等体积蒸馏水 5 d。5 d 后,将 1% DNFB 溶液 10 μL 均匀涂抹于小鼠右耳(两面)进行攻击,模型组同样涂耳但并未致敏。攻击 24 h 后小鼠眶静脉丛取血,颈椎脱臼处死小鼠,用 9 mm 直径打孔器分别在两耳同一部位打下圆耳片,称重,同时取小鼠胸腺及脾脏重。以左右耳片质量之差为肿胀度,分别以每 10 g 小鼠的脾重(mg)和胸腺重(mg)作为脾指数和胸腺指数。解剖,取心、肝、肾,精密称取各脏器质量。

取小鼠部分肝组织,常规染色,光学显微镜下观察期组织形态学变化并对肝组织形态进行病理分级、积分:肝组织结构正常,无明显变性、坏死及炎症

细胞浸润, 0 分; 肝小叶结构尚正常, 可见明显的浑浊肿胀、气球样变或脂肪变性。散在点状坏死(+), 1 分; 肝小叶结构不清, 可见明显的灶状坏死, 伴有炎症细胞浸润(++) , 2 分; 肝小叶结构不清、可见明显的片状坏死, 伴有炎症细胞浸润(+++) , 3 分; 坏死细胞弥漫性存在于肝小叶中央, 层次较多, 伴有炎症细胞浸润(++++) , 4 分。

2.3 血生化指标检测 小鼠取血, $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后血清按照试剂盒说明书检测血生化指标前列腺素 E_2 (PGE_2), $\text{TNF-}\alpha$, IL-2 , ALT , AST , PA , TBA , TBI 。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据处理, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠免疫性炎症的抑制作用 雷公藤片对 DNFB 所致小鼠 DTH 的抑制作用见表 1。雷公藤片在 $12.87 \sim 51.48\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 能显著性抑制 DNFB 所致小鼠耳肿胀, 而且具有良好的量效关系, 用 Bliss 法计算 ED_{50} , 得雷公藤片抗免疫炎症的 ED_{50} 及其 95% 可信限为 $14.58(7.01 \sim 19.06)\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。见表 1。

3.2 对小鼠药效学指标的影响 与正常组比较, 模型组小鼠 PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$, IL-2 含量明显升高 ($P < 0.01$); 雷公藤片 $25.74 \sim 51.48\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 均可引起小鼠 PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$, IL-2 含量的降低, 与模型组比较有不同的统计学差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 并呈现一定的剂量依赖关系; CTX 组血中各指标不同程度降低。见表 2。

3.3 对小鼠肝功能指标的影响 不同剂量雷公藤片连续 5 d 给药对小鼠脏器指数的影响显示: 雷公藤片对小鼠的毒性主要表现在肝脏。与正常组

表 1 雷公藤片对迟发型超敏反应小鼠免疫性炎症抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effect of Leigongteng tablet on immune-inflammation caused by DNFB in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 $/\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	肿胀度 $/\text{mg}$	抑制率 $/\%$	效应率 $/\%$
正常	-	$7.6 \pm 3.14^{2)}$	57.41	-
模型	-	17.8 ± 4.79	0.00	0.00
雷公藤片	51.48	$10.5 \pm 4.01^{2)}$	40.85	100.00
	36.55	$11.5 \pm 3.96^{2)}$	35.58	87.68
	25.74	12.2 ± 4.30	31.59	77.33
	18.28	12.6 ± 4.08	29.07	71.63
	12.87	14.9 ± 2.75	16.16	39.56
CTX	73 000	$10.3 \pm 2.23^{2)}$	42.14	-

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

表 2 雷公藤片对迟发型超敏反应小鼠中 PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-2 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect of Leigongteng tablet on levels of PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$ and IL-2 in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 $/\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	PGE_2/A	$\text{TNF-}\alpha$ $/\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-2 $/\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$
正常	-	$0.542 \pm 0.028^{2)}$	124.6 ± 10.0	$15.76 \pm 2.91^{2)}$
模型	-	0.900 ± 0.036	133.8 ± 17.4	23.28 ± 0.69
雷公藤片	51.48	$0.699 \pm 0.037^{2)}$	133.8 ± 10.4	$20.60 \pm 1.70^{2)}$
	36.55	$0.720 \pm 0.019^{2)}$	137.3 ± 6.7	$20.51 \pm 2.07^{2)}$
	25.74	$0.742 \pm 0.024^{2)}$	142.0 ± 7.8	21.11 ± 3.44
CTX	73 000	$0.640 \pm 0.063^{2)}$	123.3 ± 51.0	$19.75 \pm 1.46^{2)}$

比较, 模型组小鼠血中各肝功能指标的变化无统计学意义; 雷公藤片中、高剂量组与模型组比较, ALT , AST , TBA 均显著升高, 高剂量组 TBI 明显升高, 低剂量组仅 AST , TBI 显著升高, 均有统计学差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。PA 无明显变化。见表 3。

表 3 雷公藤片对小鼠血清中 ALT , AST , PA , TBA 和 TBI 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effect of Leigongteng tablet on levels of ALT , AST , PA , TBA and TBI in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$\text{ALT}/\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{AST}/\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{PA}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{TBA}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{TBI}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
正常	-	37.35 ± 23.31	42.58 ± 8.25	33.88 ± 8.00	32.68 ± 12.20	9.67 ± 2.56
模型	-	37.66 ± 17.29	43.91 ± 6.53	32.71 ± 11.45	37.23 ± 12.40	10.77 ± 4.82
雷公藤片	51.48	$63.75 \pm 20.15^{1)}$	$62.14 \pm 12.44^{2)}$	26.51 ± 6.50	$51.88 \pm 10.08^{2)}$	$15.00 \pm 3.67^{2)}$
	36.55	$56.74 \pm 12.91^{2)}$	$61.90 \pm 7.09^{2)}$	27.03 ± 7.08	$50.60 \pm 12.61^{2)}$	$13.23 \pm 3.39^{1)}$
	25.74	$51.86 \pm 12.38^{1)}$	$59.64 \pm 15.80^{2)}$	29.07 ± 12.13	$49.22 \pm 10.78^{1)}$	$12.96 \pm 3.00^{1)}$
CTX	73 000	$63.73 \pm 16.63^{2)}$	$57.42 \pm 9.06^{2)}$	31.13 ± 6.30	45.13 ± 14.75	10.69 ± 3.84

3.4 对小鼠肝的病理组织学检查 光学显微镜下观察, 正常组小鼠肝细胞结构正常; 模型组和各药物

剂量组小鼠的肝组织中, 出现不同程度的肝细胞水肿和炎细胞浸润。雷公藤片对小鼠肝脏组织 Riddit

分析病理积分表,见表 4。与模型组比较,雷公藤片高、中剂量组小鼠的肝脏病理分级和积分分别呈现非常显著性差异和显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 4 雷公藤片对小鼠肝脏病理分级的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 4 Effect of Leigongteng tablet on liver pathological grade ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	病理分级/只					病理积分
		I	II	III	IV	V	
正常	-	9	1	0	0	0	0.10 \pm 0.32
模型	-	8	2	0	0	0	0.20 \pm 0.67
雷公藤片	51.48	3	3	2	1	1	1.40 \pm 1.37 ²⁾
	36.55	4	3	2	1	0	1.00 \pm 1.35 ¹⁾
	25.74	6	2	1	1	0	0.70 \pm 1.64
CTX	73 000	7	3	0	0	0	0.30 \pm 1.78

4 讨论

雷公藤片为雷公藤根提取物制成的片剂,具有祛风除湿、消肿止痛、通经活络、清热解暑的功效,对自身免疫有关的疾病、原因不明的疾病(重症关节病型银屑病、结节性红斑)及子宫内膜异位均有较好的治疗效果^[6-8]。雷公藤片所含的有效成分,也是毒性成分,肝脏是雷公藤毒性易损伤器官之一,雷公藤片临床不良反应中食欲缺乏、恶心、呕吐等症状,可能与肝脏损害有关。提示在雷公藤片临床应用过程中应进行肝功能监测^[9]。

本实验采用小鼠迟发型超敏反应模型,进行雷公藤“疾病-剂量-功效-毒性”相关性研究。雷公藤片对 DNFB 所致小鼠 DTH 的抑制作用范围是 12.87 ~ 51.48 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,在 36.55 ~ 51.48 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 抑制作用更明显,雷公藤片抗迟发型免疫炎症作用的 ED_{50} 为 14.58 (7.01 ~ 19.06) $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。小鼠血中 PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$ 和 T 细胞生长因子之一 IL-2 等水平降低,提示雷公藤可能是通过抑制和减少炎性介质的释放发挥免疫炎症抑制作用的。但连续多次给药引起小鼠肝损伤,表现为厌食、怠动、体重增长缓慢;小鼠血清 ALT, AST, TBA, TBI 活性升高,肝器指数增大;肝脏出现一定病变;上述变化均呈现一定的剂量依赖关系。对雷公藤片抗小鼠免疫性炎症的“效-毒”作用剂量细分:雷公藤片抗小鼠迟发型超敏反

应免疫性炎症的起效量为 12.87 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,半数有效量 ED_{50} 为 14.58 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,治疗剂量范围为 12.87 ~ 51.48 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,雷公藤片浓度为 25.74 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时产生副作用,小鼠肝组织产生实质性病变的剂量为 102.96 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。雷公藤片在 12.87 ~ 51.48 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 对小鼠免疫性炎症有治疗作用,同时产生一定的副作用,当剂量达到 102.96 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时可引起小鼠肝脏的实质性病变,因在 51.48 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时效应率已达 100%,选用 102.96 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 作用与 51.48 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 相近,相对毒性较大,该剂量无明显临床应用意义。

雷公藤片是目前临床中应用较广泛的药物,由于其有效成分亦是有毒成分,常给患者带来毒副作用。医生对其应有充分了解,应用时从小剂量开始,并密切观察毒性反应的发生。同时,应当更深入研究雷公藤片的有效成分及其有效成分的药代动力学,将病证-剂量-功效-毒性关联评价,明确治疗的有效量、中毒量,研究药效机制以及可能存在的毒性机制,确定其安全剂量窗,为临床安全应用提供依据。

[参考文献]

- [1] 余洲,姜菊芬,陈燕萍,等.雷公藤片不良反应的防治[J].中国药房,2010,44(2):4223-4224.
- [2] 邱敏.雷公藤片的临床应用及不良反应文献研究评析[J].临床医药文献杂志,2014,1(4):566-568.
- [3] 窦洁,李孟秋,陈松,等.雷公藤甲素对小鼠免疫功能的抑制作用[J].药物生物技术,2007,14(6):429-431.
- [4] 唐宁,周红霞,周东蕊.中国雷公藤制剂治疗系统性红斑狼疮疗效的 Meta 分析[J].南京晓庄学院学报,2012(3):68-71.
- [5] 沈逸,何东仪.雷公藤免疫调节机制的研究进展[J].上海中医药杂志,2012,46(5):97-101.
- [6] 杨竹.雷公藤片治疗类风湿关节炎 74 例[J].中国药业,2011,20(14):76-77.
- [7] 邢杰,曹丽杰,赵艳辉.雷公藤片治疗巩膜炎 18 例[J].临床军医杂志,2007,35(2):176-178.
- [8] 李德平,翟华强,曹炜,等.雷公藤的药性文献回顾及其作用机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(13):299-303.
- [9] 高丽,白赞,柴智,等.雷公藤毒性反应研究进展[J].中国中医药信息杂志,2012,19(4):107-110.

[责任编辑 周冰冰]