

· 药理 ·

补骨脂对大鼠、小鼠肝毒性的比较

郭兆娟, 张晶璇, 康倩君, 吴金英, 张林, 王婷*
(北京中医药大学北京中医药研究院, 北京 100029)

[摘要] **目的:**运用均匀设计法安排大鼠、小鼠长期毒性实验,探究补骨脂不同提取物对大鼠、小鼠肝毒性的影响,寻找引起补骨脂肝毒性的药物因素。**方法:**以炮制、工艺、剂量、疗程为考察因素,采用均匀设计法安排各实验分组,220只SD大鼠与220只昆明小鼠,雌雄各半,分别分为正常组与实验1~8给药组,每日灌胃相应补骨脂(盐补骨脂50%醇提取物大鼠 $2.57\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,小鼠 $5.14\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;生补骨脂95%醇提取物大鼠 $0.51\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,小鼠 $1.02\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;盐补骨脂70%醇提取物大鼠 $1.71\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,小鼠 $3.42\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;生补骨脂水提取物大鼠 $1.03\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,小鼠 $2.06\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;盐补骨脂水提取物大鼠 $1.03\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,小鼠 $2.06\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;生补骨脂70%醇提取物大鼠 $1.71\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,小鼠 $3.42\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;盐补骨脂95%醇提取物大鼠 $0.51\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,小鼠 $1.02\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;生补骨脂50%醇提取物大鼠 $2.57\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,小鼠 $5.14\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),每周测定大鼠、小鼠体质量及摄食量1次。各疗程给药结束后,大鼠经戊巴比妥钠麻醉后,腹主动脉取血处死,小鼠采用摘眼球取血处死,取大鼠、小鼠肝脏及脑,计算脏器系数,取其血清测定肝功能相关指标,取其肝脏做苏木素-伊红(HE)染色后进行病理组织学检查。**结果:**与正常组比较,实验3组雌性大鼠肝组织脏脑比明显升高($P<0.05$),雄性小鼠实验1~3组的肝脏质量、脏体比、脏脑比明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);小鼠组织病理学表现较大鼠明显,主要表现为肝小叶中央区肝细胞肥大,以实验3组最为明显;根据多元回归方程分析,工艺与炮制、剂量、疗程均存在交互作用,工艺与肝毒性病理评分呈正相关,综合直观分析以及其他指标结果,工艺因素与补骨脂肝毒性最相关。**结论:**补骨脂具有肝毒性,其肝毒性与乙醇提取工艺有关,醇提工艺肝毒性大于水提工艺肝毒性,70%醇提肝毒性最大,且存在种属差异,小鼠肝毒性表现较大鼠明显。

[关键词] 补骨脂; 肝毒性; 均匀设计; 药物因素; 种属差异

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)22-0016-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201970

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200723.1454.029.html>

[网络出版日期] 2020-7-23 16:00

Comparative Study on Hepatotoxicity of Psoraleae Fructus in Rats and Mice

GUO Zhao-juan, ZHANG Jing-xuan, KANG Qian-jun, WU Jin-ying, ZHANG Lin, WANG Ting*
(Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine,
Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** Arrange long-term toxicity experiments by a uniform design method, so as to explore the effect of different extracts of Psoraleae Fructus on liver toxicity in rats and mice, and find the drug factors that cause psoralen liver toxicity. **Method:** Based on the factors of processing, extraction technology, dosage and treatment course, each experimental group was arranged by uniform design method. A total of 220 SD rats and 220 Kunming mice with half male and half female were divided into normal groups and drug groups 1 to 8. The corresponding drugs (50% alcohol extract of salt Psoraleae Fructus in rats $2.57\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, mice $5.14\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 95% alcohol extract of Psoraleae Fructus in rats $0.51\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, mice $1.02\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 70% alcohol extract of salt Psoraleae Fructus in rats $1.71\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, mice $3.42\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, water extract of Psoraleae Fructus in rats $1.03\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, mice $2.06\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, water extract of salt Psoraleae Fructus in rats $1.03\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, mice $2.06\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 70%

[收稿日期] 20200213(019)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81374056,81773994)

[第一作者] 郭兆娟,在读博士,从事中药毒性研究,E-mail:997411248@qq.com

[通信作者] *王婷,博士,研究员,博士生导师,从事中药毒性研究,E-mail:wangting1973@sina.com

alcohol extract of *Psoraleae Fructus* in rats $1.71 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, mice $3.42 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 95% alcohol extract of salt *Psoraleae Fructus* in rats $0.51 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, mice $1.02 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 50% alcohol extract of *Psoraleae Fructus* in rats $2.57 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, mice $5.14 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) were administered by gavage daily. The body weight and food intake of the rats and mice were measured once a week. After the treatment course, the rats were anesthetized with sodium pentobarbital, and blood was taken from the abdominal aorta, and the mice were sacrificed by removing the eyeballs, and the liver and brain were taken to calculate the organ coefficients. Serum was taken to determine liver function-related indicators, and the liver was taken for histopathological examination by hematoxylin-eosin (HE) staining. **Result:** The liver visceral-brain ratio of female rats in group 3 were significantly increased ($P<0.05$). The liver quality, visceral-body ratio and visceral-brain ratio of male mice in groups 1 to 3 were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Histopathological manifestations in mice were more obvious than those in rats. Histopathology showed hepatocyte hypertrophy in the central area of liver lobules in mice, in particular in group 3. According to the multiple regression equation, there were interactions between extraction technology, processing, dosage and treatment course, and the extraction technology was positively correlated with the pathological score of liver injury. Based on the results of visual analysis and other indicators, it is concluded that the extraction technology factor is most relevant to psoralen liver toxicity of *Psoraleae Fructus*. **Conclusion:** *Psoraleae Fructus* has the hepatotoxicity, which is related to ethanol extraction technology; alcohol extraction is more toxic than water extraction, and 70% ethanol extraction is the most toxic. Besides, there are species differences, with a more significant hepatotoxicity in mice than that in rats.

[Key words] *Psoraleae Fructus*; hepatotoxicity; uniform design; drug factors; species difference

补骨脂味辛苦、性温,归肾、脾经,具有温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻之功效,外用消风祛斑^[1]。作为临床常用中药,近年来,随着补骨脂研究的深入及其应用品种范围的扩大,无论是单用补骨脂还是含补骨脂的中药复方制剂国内外均有不良反应报道^[2-9]。目前国家药监局通报的含补骨脂复方制剂出现肝损害的中成药有仙灵骨葆口服制剂、壮骨关节丸、骨康胶囊等^[10-12]。朱云等^[10]通过对2009—2014年所在医院595例中药导致药物性肝损伤患者的药物使用情况进行统计分析,发现在涉及的中药组方中,导致药物性肝损伤(DILI)的中药补骨脂40例。随着补骨脂肝损害临床报道的增多以及动物实验研究的不断深入,已证实补骨脂具有肝毒性^[13-17],但其引起肝毒性的药物因素尚未得到阐明。由于补骨脂肝毒性的产生原因可能涉及炮制、工艺、剂量、疗程多种因素,且不同因素间可能存在交互作用,研究其肝毒性药物因素需多因素综合考察。因此,本研究以SD大鼠和昆明小鼠为实验对象,采用均匀设计的数学方法指导动物长期毒性试验,全面评价炮制、工艺、剂量、疗程四因素对补骨脂肝毒性的影响,通过生化指标及脏器系数,结合病理评分及多元回归方程,明确引起补骨脂肝毒性的药物因素,为补骨脂肝毒性研究提供有益借鉴。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠,SPF级,雌雄各半,6周龄,体质量(180 ± 10)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2016-0006。昆明种小鼠,SPF级,雌雄各半,7周龄,体质量(20 ± 2)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2016-0006。本研究经北京中医药大学学术委员会实验动物伦理分委员会审查通过,编号BUCM-4-2019041901-2013。

1.2 药物 生补骨脂购自北京同仁堂科技发展股份有限公司(河北保定,批号20171026),经北京中医药大学中药学院李向日教授鉴定,为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* 的干燥成熟果实。生补骨脂按照2015年版《中国药典》盐炙法(通则0213)进行炮制得到盐补骨脂,并按照《中国药典》规定的补骨脂含量测定方法对生补骨脂及盐补骨脂进行含量测定,经测定得生补骨脂中补骨脂素质量分数0.493%,异补骨脂素质量分数0.442%;盐补骨脂中补骨脂素质量分数0.534%,异补骨脂素质量分数0.474%,均符合标准。

1.3 试剂 血液生化检测试剂盒[贝克曼库尔特实验系统(苏州)有限公司,批号AUZ3777],苏木素-伊红(HE)染色液(北京九州柏林生物科技有限公司,批号20190305)。

1.4 仪器 CX4 Pro型全自动生化分析仪(美国Beckman Coulter公司);SIGMA3-15型台式高速离心机[曦玛离心机(扬州)有限公司];YP1002N型电子天平(上海京孚仪器有限公司);RM2245型组织切片机,ASP300S型组织脱水机(德国徕卡仪器有限公司);BX53型自动化智能型正置显微镜(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 运用均匀试验设计方法安排动物长期毒性实验分组 本研究从补骨脂的炮制、工艺、剂量、疗程4因素出发,利用均匀设计的数学方法,结合文献研究及临床不良反应报道确定各因素的水平间隔,作为“步长(step)”,并依此划分各因素的考察水平,编

制因素-水平表,见表1。根据所考察因素及水平数选择用U8(8⁵)均匀设计使用表^[18],利用拟水平方法,依据实际应用情况和专业知识,将各因素的水平看齐(均设定为8个水平),即得到长期毒性实验安排分组,见表2。

表1 补骨脂长期毒性实验因素水平

Table 1 Factor levels of psoralen long-term toxicity test

水平	炮制	工艺(提取时醇浓度)/%	剂量/g	疗程/月
1	生补骨脂	0	6	1
2	盐补骨脂	50	12	3
3	-	70	20	6
4	-	95	30	-

表2 补骨脂肝毒性研究大鼠、小鼠实验分组

Table 2 Experimental group of Psoraleae Fructus hepatotoxicity in rats and mice

实验号	炮制品	工艺(乙醇体积分数)/%	小鼠剂量/g·kg ⁻¹	大鼠剂量/g·kg ⁻¹	疗程/月
实验1	盐补骨脂	50	5.14	2.57	1
实验2	生补骨脂	95	1.02	0.51	1
实验3	盐补骨脂	70	3.42	1.71	1
实验4	生补骨脂	0	2.06	1.03	3
实验5	盐补骨脂	0	2.06	1.03	3
实验6	生补骨脂	70	3.42	1.71	3
实验7	盐补骨脂	95	1.02	0.51	6
实验8	生补骨脂	50	5.14	2.57	6

2.2 药材提取 各组提取物按照表1中相应工艺进行提取。补骨脂水提取工艺,加8倍量水提取2次,每次1.5 h,合并2次提取液后浓缩,于真空干燥箱中60℃条件下减压干燥,干膏研磨成细粉,即得水提取物;补骨脂醇提取工艺,加8倍量相应质量分数的乙醇加热回流提取2次,每次提取1.5 h,合并2次提取液后回收乙醇,至提取液无醇味后,浓缩,于真空干燥箱中60℃条件下减压干燥成稠膏,即得乙醇提取物。提取结果见表3。

2.3 大鼠、小鼠分组及给药 SD大鼠与昆明种小鼠各220只,雌雄各半,适应性饲养5 d,按照表2分别将大鼠、小鼠随机分为1~8给药组和正常组,其中正常组在每个疗程中各设一组,共3组,每组20只。各组药物用0.5%羧甲基纤维素溶液溶解并配至相应浓度,大鼠、小鼠按照表2中设定剂量每日连续、定点灌胃给予相应的药物,正常组给与0.5%羧甲基纤维素溶液,不设恢复期。每日观察大鼠、小鼠的行为活动、呼吸、粪便性状等一般体征,每周固定时间测定大鼠、小鼠体质量及摄食量1次。

表3 补骨脂提取物出膏率

Table 3 Extraction ratio of Psoraleae Fructus

组别	炮制品	乙醇体积分数/%	出膏率/%
实验1	盐补骨脂	50	73.75
实验2	生补骨脂	95	42.96
实验3	盐补骨脂	70	65.40
实验4	生补骨脂	0	22.37
实验5	盐补骨脂	0	20.07
实验6	生补骨脂	70	50.85
实验7	盐补骨脂	95	31.88
实验8	生补骨脂	50	36.74

2.4 大鼠、小鼠取材及血清生化学指标检测 各疗程大鼠、小鼠给药结束后,禁食(自由饮水)12 h,其中大鼠经戊巴比妥钠(40 mg·kg⁻¹)麻醉后,腹主动脉取血5 mL,小鼠摘眼球取血约1.5 mL,不抗凝,静置4 h,室温下3 500 r·min⁻¹离心10 min,分离血清,采用全自动生化分析仪检测天门冬氨酸氨基转移酶(AST),碱性磷酸酶(ALP),丙氨酸氨基转移酶(ALT),直接胆红素(DBIL),间接胆红素(IBIL),

总胆红素(TBIL)等指标。

2.5 系统尸解和肝脏系数测定 大鼠、小鼠失血死亡后,对其进行解剖,观察记录各动物主要脏器的大小、色泽、质地等形态特征,取出完整肝脏和脑,称质量,结合体质量检测,计算脏器系数,脏器比=肝脏湿质量(g)/体质量(g),脏脑比=肝脏湿质量(g)/脑湿质量(g)。

2.6 病理组织学检查 将所取各组大鼠、小鼠的肝脏依次经过10%甲醛固定、脱水、石蜡包埋、常规切片及HE染色,光学显微镜观察肝脏病理变化。根据相关文献[19],肝脏病理学评分主要依据肝小叶中央区肝细胞肥大病变范围评分,具体评分,肝细胞肥大(肝细胞胞体增大,胞浆可略疏松,染色略浅),0分,肝小叶内未见明显肝细胞肥大;1分,少数肝细胞肥大,病变仅累及肝小叶中央带部分肝细胞;2分,一些肝细胞肥大,病变累及肝小叶中央带全部肝细胞;3分,较多肝细胞肥大,病变超出肝小叶中央带,累及至肝小叶中间带肝细胞;4分,多数肝细胞肥大,病变累及全肝小叶范围。

2.7 肝毒性回归分析 以均匀设计中炮制、工艺、剂量、疗程因素与其水平的不同组合作为“解释变量”,分别设为 A_1, A_2, A_3, A_4 ,以反映肝毒性的不同效应指标作为“因变量”,利用SAS9.4软件进行多元回归分析,得到理论上毒理学指标肝毒性最大时的各因素水平组合。鉴于组织病理学评分结果属于动物肝毒性研究的金指标,故以其作为“因变量”设为 Y ,选择最小 R^2 增量法,利用SAS软件,进行多元回归分析,进而推导出多变量的最优回归模型,同时结合其他检测指标结果及临床实际应用情况,用数学模型阐明各补骨脂肝毒性与各因素之间的关系。

2.8 统计学方法 采用SAS 8.2统计软件进行数据处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用One-way ANOVA方法比较实验组与正常组的差异,方差齐时采用LSD方法分析,方差不齐时采用Dunnett's T_3 方法分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠、小鼠一般体征的影响 大鼠给药期间,实验5组大鼠出现较轻程度脱毛,实验6组大鼠脱毛明显,其余各组大鼠毛发、活动、呼吸、腺体分泌未见异常。小鼠给药期间,各组小鼠毛发、行为活动、呼吸、腺体分泌未见异常。

3.2 对大鼠、小鼠血清肝功能生化指标的影响 与同期正常组比较,雌性大鼠实验6组ALP降低($P <$

0.05),实验1,2组TBIL明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),实验8组TBIL升高($P < 0.05$),但无毒理学意义;实验2组DBIL降低($P < 0.05$);实验1组IBIL降低($P < 0.05$),实验5,8组IBIL升高($P < 0.05$)。雄性大鼠实验7,8组ALP及实验7组AST明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),但无毒理学意义;实验5组TBIL与IBIL明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),各组其他指标差异无统计学意义。见表4~7。

补骨脂提取物对雌性小鼠血清生化指标的影响较大鼠明显。与同期正常组比较,雌性小鼠实验4组ALP降低($P < 0.05$);实验4,6组ALT升高($P < 0.05$),实验5组DBIL,IBIL与实验6组TBIL, DBIL,IBIL明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),但无毒理学意义。与同期正常组比较,雄性小鼠实验4,6组ALP降低($P < 0.05$),实验4组ALT显著降低($P < 0.01$),实验4,5,6组AST显著降低($P < 0.01$),实验1组TBIL, DBIL,IBIL明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),但无毒理学意义,各组其他指标差异无统计学意义。见表7。

3.3 对大鼠、小鼠体质量的影响 给药期间,实验6,7组雌性大鼠体质量明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),实验6,7,8组雄性大鼠体质量明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),其余各组差异无统计学意义。与同期正常组比较,实验6组雌性小鼠体质量明显降低($P < 0.05, P < 0.01$);实验6组雄性小鼠体质量显著降低($P < 0.05, P < 0.01$),其余各组差异无统计学意义。

3.4 对大鼠、小鼠脏器系数的影响 与同期正常组比较,雌性大鼠实验7组肝脏质量降低($P < 0.05$),实验3组肝脏质量、脏器比及实验6组脏器比明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),实验1,2,3组脏脑比明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),但无显著毒理学意义,其余各组脏器系数无明显变化。见表8。与同期正常组比较,雄性大鼠实验6组肝脏质量降低($P < 0.01$);实验2,3,7组脏器比显著升高($P < 0.05, P < 0.01$),实验6组脏脑比降低($P < 0.05$),但无显著毒理学意义,其余各组脏器系数无明显变化。见表9。

与同期正常组比较,雌性小鼠实验3组肝脏质量及实验6,7,8组的脏器比明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),雄性小鼠实验1,2,3组的肝脏质量、脏器比、脏脑比与实验6组的脏器比明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),以实验3组升高最为显著,各组其他指标差异无统计学意义。见表9。

3.5 对大鼠、小鼠肝组织病理的影响 正常组大鼠除自发病变外未见与给药相关的病理改变,各给药

表 4 补骨脂不同提取物对雌性大鼠血液生化指标的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of different extracts of Psoraleae Fructus on blood biochemical indexes of female rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALP /U·L ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹	AST /U·L ⁻¹	TBIL /μmol·L ⁻¹	DBIL /μmol·L ⁻¹	IBIL /μmol·L ⁻¹
正常(1月)	-	94.96±20.14	32.01±7.29	164.28±30.02	2.93±0.36	0.75±0.18	2.19±0.23
实验1	2.57	83.71±17.86	34.14±6.81	165.89±39.16	2.56±0.32 ²⁾	0.61±0.17	1.96±0.25 ¹⁾
实验2	0.51	94.39±25.35	27.37±3.54	161.23±29.79	2.58±0.20 ¹⁾	0.60±0.15 ¹⁾	1.99±0.19
实验3	1.71	91.29±21.17	38.03±28.90	167.98±36.76	2.93±0.32	0.69±0.14	2.24±0.24
正常(3月)	-	40.99±11.90	38.20±10.50	157.76±30.91	1.88±0.62	0.77±0.15	1.11±0.52
实验4	2.06	46.67±19.07	49.30±19.99	216.29±108.38	2.13±0.77	0.75±0.14	1.37±0.68
实验5	2.06	47.49±16.19	42.30±13.17	184.90±61.33	2.55±0.59 ³⁾	0.85±0.18	1.70±0.47 ³⁾
实验6	1.71	67.90±37.28 ³⁾	35.00±12.26	137.27±32.03	2.05±0.25	0.63±0.12	1.42±0.26
正常(6月)	-	22.63±7.74	35.10±16.78	135.73±44.15	2.83±0.43	0.83±0.14	2.00±0.38
实验7	0.51	25.55±9.15	30.38±6.99	129.81±21.51	3.01±0.38	0.95±0.16	2.06±0.29
实验8	2.57	31.27±16.13	35.14±11.28	155.90±34.42	3.32±0.25 ⁵⁾	0.97±0.16	2.35±0.20 ⁵⁾

注:与正常(1月)组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与正常(3月)组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01;与正常(6月)组比较⁵⁾P<0.05,⁶⁾P<0.01(表5~9同)。

表 5 补骨脂不同提取物对雄性大鼠血液生化指标的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Effect of different extracts of Psoraleae Fructus on blood biochemical indexes of male rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALP /U·L ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹	AST /U·L ⁻¹	TBIL /μmol·L ⁻¹	DBIL /μmol·L ⁻¹	IBIL /μmol·L ⁻¹
正常(1月)	-	222.05±37.86	45.42±11.66	177.46±41.31	2.29±0.30	0.58±0.24	1.72±0.24
实验1	2.57	182.33±45.75	41.15±7.45	179.31±39.83	2.09±0.18	0.49±0.09	1.60±0.21
实验2	0.51	220.17±43.85	40.48±4.23	169.93±35.61	2.08±0.25	0.49±0.15	1.58±0.15
实验3	1.71	179.74±59.97	38.68±6.59	181.85±42.33	2.17±0.26	0.52±0.16	1.65±0.30
正常(3月)	-	96.76±20.70	52.67±14.56	188.47±59.11	1.50±0.37	0.61±0.12	0.89±0.28
实验4	2.06	87.51±23.85	40.00±8.45	142.43±18.90	1.25±0.40	0.53±0.10	0.72±0.39
实验5	2.06	87.96±15.15	52.78±22.42	182.32±52.45	1.07±0.17 ⁴⁾	0.54±0.06	0.52±0.17 ³⁾
实验6	1.71	86.01±17.36	56.50±13.28	165.42±44.44	1.47±0.37	0.59±0.16	0.88±0.33
正常(6月)	-	56.29±14.01	32.80±13.84	123.28±35.30	2.37±0.43	0.69±0.16	1.67±0.31
实验7	0.51	75.50±12.76 ⁵⁾	32.88±9.30	156.48±37.65 ⁵⁾	2.50±0.45	0.70±0.12	1.81±0.39
实验8	2.57	83.18±26.45 ⁶⁾	34.50±3.78	136.71±26.84	2.59±0.34	0.76±0.10	1.83±0.26

组大鼠均有部分动物肝脏组织可见轻微脂肪变性,以小泡或微泡为主。小鼠除正常组外,主要表现为轻微至中度的肝小叶中央区肝细胞肥大,细胞染色浅,以实验3组动物最为明显,在发生例数和病变程度上均有升高,个别小鼠伴肝脏脂肪变性,且病变程度较大鼠明显。见图1~4,表10,11。

3.6 多元回归分析 以均匀设计中炮制、工艺、剂量、疗程因素与其水平的不同组合作为“解释变量”,组织病理学评分结果为“因变量”设为,利用SAS软件,进行多元回归分析。鉴于肝脏病理结果为毒性评价金指标,而小鼠肝脏毒性表现较大鼠更为明显,故选择以小鼠肝脏病理评分进行多元回归分析,得出雌性小鼠回归方程为 $Y=2.954 21-$

$0.756 50A_1-0.009 83A_1A_2+0.063 04A_1A_3+0.002 68A_2A_3-0.002 97A_2A_4-0.246 40A_3+0.000 018 17A_3^2$, 雄性小鼠回归方程为 $Y=0.173 91-0.005 50A_1A_2+0.008 33A_1A_3+0.002 41A_2A_3-0.005 30A_2A_4-0.003 08A_3^2-0.009 96A_3A_4+0.069 83A_4^2$ 。由两方程可知,工艺(A_2)与炮制(A_1),剂量(A_3),疗程(A_4)均存在交互作用,工艺与肝毒性病理评分呈正相关,综合直观分析以及其它指标结果,工艺因素与补骨脂肝毒性最相关,且70%醇提肝毒性最大。

4 讨论

4.1 关于补骨脂肝毒性药物因素的探讨 补骨脂化学成分复杂多样,主要含有香豆素类、黄酮类、单萜酚类化合物,具有免疫调节、抗肿瘤、抗炎、抗菌、

表6 补骨脂不同提取物对雌性小鼠血液生化指标的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 6 Effect of different extracts of Psoraleae Fructus on blood biochemical indexes of female mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALP /U·L ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹	AST /U·L ⁻¹	TBIL /μmol·L ⁻¹	DBIL /μmol·L ⁻¹	IBIL /μmol·L ⁻¹
正常(1月)	-	158.62±54.64	48.20±33.62	152.00±63.55	2.36±0.80	0.55±0.22	1.81±0.63
实验1	5.14	155.03±36.04	48.30±60.14	145.86±56.68	2.70±0.61	0.67±0.20	2.03±0.44
实验2	1.02	159.75±44.35	58.50±46.60	145.76±54.94	2.56±0.47	0.62±0.14	1.95±0.36
实验3	3.42	147.32±51.41	36.33±13.93	132.90±28.42	2.49±0.52	0.58±0.12	1.91±0.43
正常(3月)	-	99.73±27.85	27.00±3.43	132.90±24.00	1.45±0.47	0.41±0.11	1.04±0.47
实验4	2.06	72.84±36.34 ³⁾	40.78±13.15 ³⁾	165.60±79.37	2.04±0.57	0.53±0.09	1.51±0.53
实验5	2.06	90.99±15.92	32.10±16.22	151.21±70.27	1.99±0.81	0.56±0.10 ³⁾	1.59±0.59 ³⁾
实验6	3.42	104.07±31.80	41.50±13.49 ³⁾	135.85±23.87	2.37±0.84 ⁴⁾	0.62±0.16 ⁴⁾	1.75±0.71 ³⁾
正常(6月)	-	92.20±25.49	87.00±177.59	235.47±292.85	2.76±0.91	0.70±0.19	2.06±0.85
实验7	1.02	97.45±26.49	35.67±12.49	194.90±154.78	2.69±0.96	0.76±0.12	1.93±0.89
实验8	5.14	84.03±25.78	33.78±7.38	135.67±22.97	2.80±0.56	0.66±0.14	2.14±0.49

表7 补骨脂不同提取物对雄性小鼠血液生化指标的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 7 Effect of different extracts of Psoraleae Fructus on blood biochemical indexes of male mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALP /U·L ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹	AST /U·L ⁻¹	TBIL /μmol·L ⁻¹	DBIL /μmol·L ⁻¹	IBIL /μmol·L ⁻¹
正常(1月)	-	92.71±33.86	33.90±7.81	128.04±34.24	2.94±0.69	0.59±0.16	2.35±0.54
实验1	5.14	72.10±32.10	43.90±25.04	188.83±235.26	3.62±0.75 ¹⁾	0.77±0.19 ¹⁾	2.85±0.60 ¹⁾
实验2	1.02	99.94±62.95	39.70±14.05	116.66±20.93	3.03±0.56	0.63±0.13	2.40±0.48
实验3	3.42	94.03±38.16	36.50±9.20	106.08±14.04	3.12±0.37	0.65±0.10	2.47±0.31
正常(3月)	-	48.73±20.34	89.90±106.18	442.72±320.99	2.94±0.71	0.64±0.16	2.29±0.59
实验4	2.06	27.97±15.42 ³⁾	26.50±7.32 ⁴⁾	110.25±28.20 ⁴⁾	2.23±1.08	0.53±0.14	1.70±0.96
实验5	2.06	48.79±14.40	41.40±35.84	138.29±58.66 ⁴⁾	2.72±0.69	0.57±0.16	2.15±0.60
实验6	3.42	67.33±18.86 ³⁾	37.33±18.37	177.09±187.97 ⁴⁾	3.48±0.75	0.73±0.18	2.75±0.61
正常(6月)	-	56.26±18.90	57.89±52.35	316.09±213.09	2.97±0.77	0.62±0.18	2.35±0.67
实验7	1.02	43.20±20.89	58.67±68.89	162.41±61.02	2.81±0.37	0.55±0.11	2.26±0.32
实验8	5.14	44.15±14.86	37.10±24.50	243.23±163.50	3.54±0.68	0.72±0.19	2.82±0.54

雌激素样等多种药理作用^[20-22]。工艺决定了中药发挥药效作用的物质基础。科学合理的工艺既可以保证药物的有效性,也可最大限度减少安全性方面的风险,而不合理的工艺很可能会产生或增加安全性方面的风险。中药新药“仙牛健骨颗粒”^[23]在临床实验过程中出现了严重的肝损伤报道,经回顾分析发现,其处方源于临床经验方,原临床使用方法为全方水煎,未出现不良反应报道,但新药研发处方中补骨脂改为70%醇提工艺后则出现与药物自身毒性明显相关的肝损伤。该事件提示应该提升对潜在毒性中药的重视程度,加强对潜在毒性中药的毒性研究,一些传统认为无毒的药材由于工艺的改变可能导致毒性成分的产生或增加从而产生毒性。考虑到中药的安全性受基原、炮制、工艺、剂

量、疗程等多种因素影响,研究中药毒性产生原因,除患者自身个体体质因素外,考察单一因素对中药安全性的影响忽略了不同因素间的交互作用,必须综合考虑多种因素及同一种因素的不同水平,须借助数学方法来研究多因素的问题。本研究创新运用均匀设计方法首次综合评价炮制、工艺、剂量、疗程四因素对补骨脂肝毒性的影响,通过动物实验证实了补骨脂乙醇提取物具有肝毒性,醇提毒性大于水提,70%醇提肝毒性最大,揭示了醇提工艺是补骨脂出现肝损伤的原因之一,为系统评价中药毒性的方法学研究提供参考。

4.2 关于中药肝毒性种属差异的问题 研究显示,在长期毒性实验中,常出现毒性反应种属差异现象,即一些药物毒性小鼠表现更明显,大鼠则毒性

表8 补骨脂不同提取物对大鼠脏器系数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 8 Effect of different extracts of Psoraleae Fructus on organ coefficient of rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	雌性				雄性			
		体质量 /g	肝脏质量 /g	脏体比 /g·(100g) ⁻¹	脏脑比 /g·g ⁻¹	体质量 /g	肝脏质量 /g	脏体比 /g·(100g) ⁻¹	脏脑比 /g·g ⁻¹
正常(1月)	-	252.66±22.89	6.97±0.79	2.76±0.15	3.70±0.41	415.40±21.48	11.79±0.94	2.84±0.10	5.86±0.48
实验1	2.57	256.48±13.85	7.37±0.53	2.88±0.20	4.27±0.46 ¹⁾	388.93±31.41 ¹⁾	11.57±1.28	2.97±0.17	6.17±0.64
实验2	0.51	261.33±14.04	7.46±0.82	2.85±0.18	4.33±0.63 ²⁾	390.59±18.59	12.10±1.16	3.10±0.22 ²⁾	6.30±0.65
实验3	1.71	252.28±17.90	7.88±0.72 ¹⁾	3.12±0.20 ²⁾	4.14±0.38 ¹⁾	395.44±36.81	12.54±1.49	3.17±0.13 ²⁾	6.22±0.74
正常(3月)	-	322.25±39.99	7.94±1.23	2.46±0.20	4.05±0.69	584.37±71.04	15.10±2.68	2.58±0.27	7.00±1.16
实验4	1.03	312.94±30.92	8.02±1.06	2.56±0.16	4.08±0.60	541.56±52.92	13.21±1.33	2.44±0.17	6.24±0.63
实验5	1.03	297.22±27.91	7.70±0.65	2.60±0.15	3.96±0.28	551.82±55.45	13.78±2.18	2.49±0.19	6.58±1.07
实验6	1.71	286.81±25.27 ³⁾	8.31±0.91	2.90±0.17 ⁴⁾	4.33±0.61	464.82±59.33 ⁴⁾	12.40±1.80 ⁴⁾	2.66±0.12	6.07±0.72 ³⁾
正常(6月)	-	371.55±38.71	9.57±0.99	2.36±0.75	4.36±1.42	687.01±75.56	15.06±1.72	2.19±0.11	7.05±0.80
实验7	0.51	342.15±29.73	8.67±0.90 ⁵⁾	2.53±0.12	4.48±0.69	578.47±56.32 ⁶⁾	13.77±2.09	2.38±0.27 ⁵⁾	6.27±1.11
实验8	2.57	365.94±45.45	8.73±0.70	2.40±0.16	4.37±0.38	632.29±79.58	14.88±1.67	2.36±0.17	6.84±0.74

表9 补骨脂不同提取物对小鼠脏器系数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 9 Effect of different extracts of Psoraleae Fructus on organ coefficient of mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	雌性				雄性			
		体质量 /g	肝脏质量 /g	脏体比 /g·(100g) ⁻¹	脏脑比 /g·g ⁻¹	体质量 /g	肝脏质量 /g	脏体比 /g·(100g) ⁻¹	脏脑比 /g·g ⁻¹
正常(1月)	-	35.40±2.31	1.25±0.23	3.87±3.10	2.91±0.72	46.53±3.50	1.51±0.33	3.25±0.69	3.32±0.51
实验1	5.14	33.78±3.65	1.32±0.28	3.39±1.03	3.39±1.03	46.39±3.43	2.06±0.19 ²⁾	4.42±0.63 ²⁾	4.61±1.30 ²⁾
实验2	1.03	34.54±4.54	1.46±0.25	3.66±1.25	3.66±1.25	46.01±2.30	1.85±0.19 ¹⁾	4.02±0.32 ²⁾	4.01±0.64 ¹⁾
实验3	3.42	33.84±1.86	1.51±0.20 ¹⁾	3.64±0.65	3.64±0.65	46.50±4.41	2.19±0.43 ²⁾	4.68±0.64 ²⁾	5.21±2.11 ²⁾
正常(3月)	-	43.72±6.58	1.55±0.17	3.56±0.28	3.40±0.40	51.15±5.06	2.06±0.20	4.05±0.40	4.41±0.40
实验4	2.06	41.39±5.09	1.63±0.27	3.94±0.47	3.42±0.54	51.88±3.27	2.18±0.33	4.19±0.50	4.78±0.71
实验5	2.06	43.99±5.16	1.67±0.24	3.80±0.47	3.55±0.44	53.67±6.18	2.08±0.29	3.89±0.54	4.45±0.59
实验6	3.42	36.01±2.57 ⁴⁾	1.62±0.26	4.47±0.49 ⁴⁾	3.77±0.60	46.77±3.37 ³⁾	2.14±0.27	4.57±0.43 ³⁾	4.92±0.80
正常(6月)	-	50.04±7.56	1.57±0.27	3.09±0.32	3.30±0.50	60.11±7.47	2.34±0.39	3.84±0.72	4.97±0.91
实验7	1.03	44.63±6.29	1.60±0.30	3.52±0.38 ⁵⁾	3.49±0.62	59.17±4.04	2.28±0.18	3.78±0.32	4.95±0.44
实验8	5.14	45.55±4.89	1.70±0.29	3.65±0.36 ⁶⁾	3.66±0.64	64.69±9.86	2.37±0.29	3.61±0.27	4.94±0.60

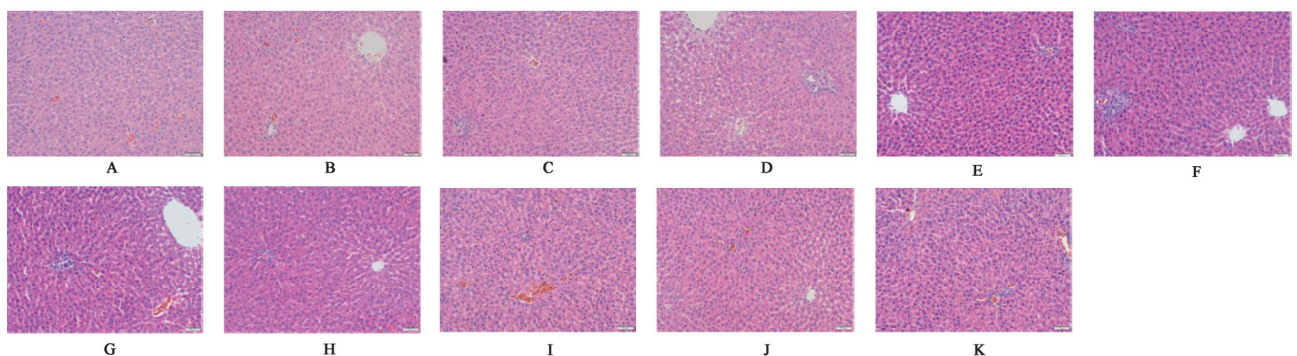


图1 补骨脂提取物对雌性大鼠肝脏损伤的影响(HE,×400)
A. 正常组(1月);B. 实验1组;C. 实验2组;D. 实验3组;E. 正常组(3月);F. 实验4组;G. 实验5组;H. 实验6组;I. 正常组(6月);J. 实验7组;K. 实验8组(图2~4同)

Fig. 1 Effect of Psoraleae Fructus on degree of liver injury in female rats(HE,×400)

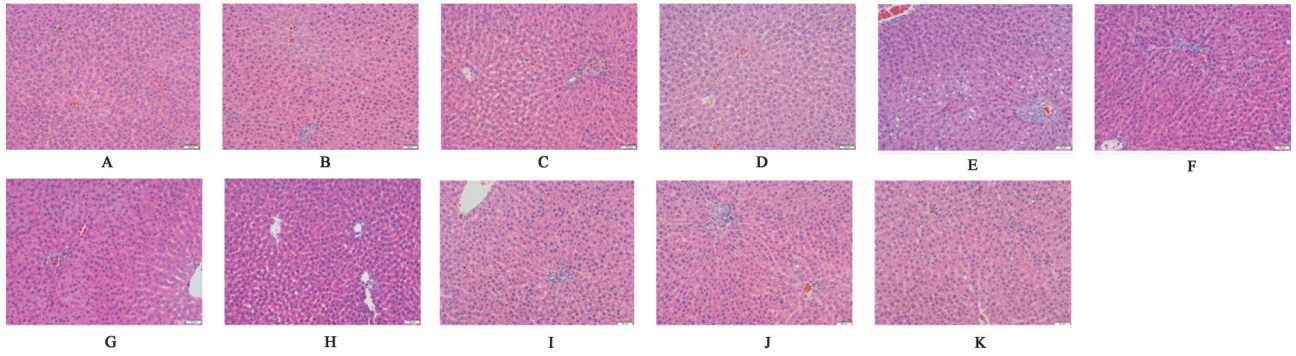


图2 补骨脂提取物对雄性大鼠肝脏损伤的影响(HE,×400)

Fig. 2 Effect of Psoraleae Fructus on degree of liver injury in male rats(HE,×400)

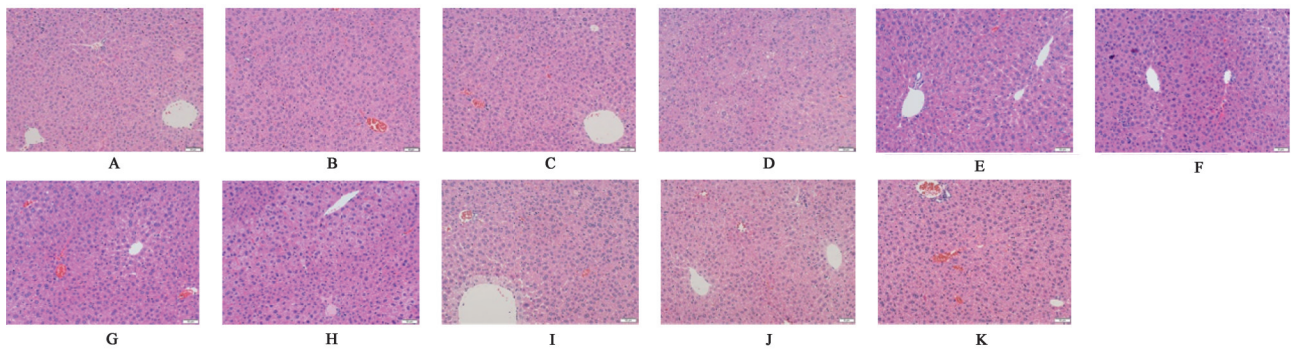


图3 补骨脂提取物对雌性小鼠肝脏损伤的影响(HE,×400)

Fig. 3 Effect of Psoraleae Fructus on degree of liver injury in female mice(HE,×400)

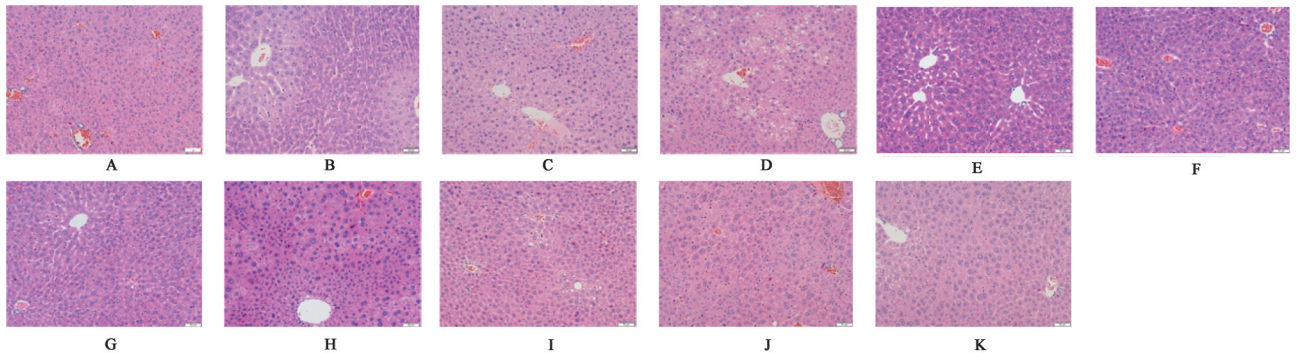


图4 补骨脂提取物对雄性小鼠肝脏损伤的影响(HE,×400)

Fig. 4 Effect of Psoraleae Fructus on degree of liver injury in male mice(HE,×400)

表现较弱或未表现出毒性。多项实验证实对乙酰氨基酚(APAP)引起的肝毒性在动物实验中表现不同,大剂量的APAP对小鼠有明显肝脏损伤作用,而对大鼠肝脏则无明显损伤^[24-25],其原因与小鼠更易产生氧化应激有关^[26-27]。此外,药物代谢在不同种属间有很大差异,不同种属动物对同一药物的代谢途径各不相同,这是由于参与药物代谢的某些(或某种)酶的有无或活性差异所致。研究表明,补骨脂素给药影响肝脏CYP1A2,CYP2A6,CYP2D1及CYP2E1的表达,并且这种影响存在种属差异^[28]。本研究证实补骨脂肝毒性存在种属差异,小鼠较大

鼠显著。这提示在中药新药非临床安全性评价中,应关注动物种属的选择。

综上,本研究从炮制、工艺、剂量、疗程4因素出发,将均匀设计方法应用于补骨脂肝毒性研究,通过平行开展大鼠、小鼠长期毒性实验,结合多元回归和综合分析,明确了补骨脂肝毒性与工艺因素相关,70%乙醇提取物肝毒性最大,且存在种属差异。以期为中药毒性产生原因的方法学提供借鉴,为含补骨脂的中药新药研发和药品评价提供参考,也为含补骨脂已上市中成药的减毒研究提供思路。

表10 补骨脂对雌性小鼠肝脏病理评分的影响

Table 10 Effect of Psoraleae Fructus on liver pathological score of female mice

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	中央区肝细胞肥大 ($\bar{x}\pm s, n=10$)/分	中央区肝细胞肥大发生率/%			
			0分	1分	2分	3分
正常(1月)	-	0	100	0	0	0
实验1	5.14	0.10±0.32	90	10	0	0
实验2	1.02	0.10±0.32	90	10	0	0
实验3	3.42	1.40±1.51	50	0	10	40
正常(3月)	-	0	100	0	0	0
实验4	2.06	0	100	0	0	0
实验5	2.06	0	100	0	0	0
实验6	3.42	0.80±1.03	50	30	10	10
正常(6月)	-	0	100	0	0	0
实验7	1.02	0	100	0	0	0
实验8	5.14	0	100	0	0	0

注:小鼠肝脏病理评分4分均为0(表11同)。

表11 补骨脂对雄性小鼠肝脏病理评分的影响

Table 11 Effect of Psoraleae Fructus on liver pathological score of male mice

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	中央区肝细胞肥大 ($\bar{x}\pm s, n=10$)/分	中央区肝细胞肥大发生率/%			
			0分	1分	2分	3分
正常(1月)	-	0	100	0	0	0
实验1	5.14	0.50±0.85	70	10	20	0
实验2	1.02	0.00±0.00	100	0	0	0
实验3	3.42	1.65±1.38	40	0	20	40
正常(3月)	-	0	100	0	0	0
实验4	2.06	0.20±0.42	80	20	0	0
实验5	2.06	0.10±0.32	90	10	0	0
实验6	3.42	0.80±1.14	60	10	20	10
正常(6月)	-	0	100	0	0	0
实验7	1.02	0.10±0.32	90	10	0	0
实验8	5.14	0.10±0.32	90	10	0	0

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:187-188.
- [2] DEBORAH A S, STEWART M. A rare case of acute hepatitis induced by use of Babchi seeds as an ayurvedic remedy for vitiligo [J]. BMJ Case Rep, 2014, pii: bcr2013200958.
- [3] NAM S W, BAEK J T, LEE D S, et al. A case of acute cholestatic hepatitis associated with the seeds of psoralea acorylifolia (Boh-Gol-Zhee) [J]. Clin Toxicol (Phila), 2005, 43(6): 589-591.
- [4] 李颖君, 黄吟月. 补骨脂致药物性肝损伤一例[J]. 上海医药, 2016, 37(24): 41-42.
- [5] LI A, GAO M, ZHAO N, et al. Acute liver failure associated with Fructus Psoraleae: a case report and literature review [J]. BMC Complement Altern Med, 2019, 19(1): 84.
- [6] 朱兰, 逢瑜, 杨乐, 等. 骨康胶囊肝损伤风险特点及因素分析[J]. 中国药物警戒, 2018, 15(4): 248-250, 256.
- [7] 单小雯, 梁锦锋, 单伟光, 等. 骨康胶囊致不良反应93例分析[J]. 中国药房, 2015, 26(2): 236-239.
- [8] 吴慧敏, 姚志刚. 骨康胶囊所致药物性肝损害二例[J]. 上海医药, 2018, 39(24): 33-34.
- [9] 周学士, 尹翠兰, 陆忠华, 等. 骨康胶囊引起严重肝损害2例及经验教训[J]. 实用肝脏病杂志, 2017, 20

- (2):250-251.
- [10] 朱云,李永纲,王萋,等. 595例中药导致肝损伤临床特征分析[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(1): 44-48.
- [11] 国家食品药品监督管理总局. 药品不良反应信息通报(第16期)警惕壮骨关节丸引起的肝损害[EB/OL]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0078/32614.html>, 2008-8-9/2020-02-10.
- [12] 朱兰,逢瑜,杨乐,等. 骨康胶囊肝损伤风险特点及因素分析[J]. 中国药物警戒, 2018, 15(4): 248-250, 256.
- [13] 杨莉,王昭昕,卢国彦,等. 补骨脂不同提取部位大鼠给药3个月的毒性比较研究[J]. 药物评价研究, 2019, 42(8): 1531-1536.
- [14] 杨莉,王昭昕,卢国彦,等. 补骨脂水提药渣大鼠三个月长期毒性试验研究[J]. 药物评价研究, 2019, 42(6): 1128-1134.
- [15] YU Y, WANG P, YU R, et al. Long-term exposure of psoralen and isopsoralen induced hepatotoxicity and serum metabolites profiles changes in female rats[J]. *Metabolites*, 2019, 9(11): E263.
- [16] WANG Y, ZHANG H, JIANG J M, et al. Hepatotoxicity induced by psoralen and isopsoralen from *Fructus Psoraleae*: Wistar rats are more vulnerable than ICR mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 3(125): 133-140.
- [17] GAO Y, WANG Z, TANG J, et al. New incompatible pair of TCM: *Epimedii Folium* combined with *Psoraleae Fructus* induces idiosyncratic hepatotoxicity under immunological stress conditions [J]. *Front Med*, 2020, 14(3): 68-80.
- [18] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 13.
- [19] 李品,王琦,彭莉,等. 痔血胶囊水提物和醇提物对大鼠肝毒性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(8): 154-159.
- [20] 吴疆,魏巍,袁永兵. 补骨脂的化学成分和药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 217-219.
- [21] 李笑甜,宋忠臣. 补骨脂及其活性成分免疫调节作用研究进展[J]. 现代免疫学, 2017, 37(1): 80-83.
- [22] 李卓清,陈志永,徐小昆,等. 补骨脂中活性成分的药代动力学研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2016, 30(1): 87-90.
- [23] 王停,董润生. 一起中药临床试验严重不良事件带给我们的思考[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(14): 1185-1187.
- [24] MITCHELL J R, JOLLOU D J, POTTER W Z, et al. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1973, 187(1): 185-194.
- [25] MCGILL R M, WILLIAMS D C, XIE Y C, et al. Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 264(3): 387-394.
- [26] JAESCHKE H, RAMACHANDRAN A. Oxidant stress and lipid peroxidation in acetaminophen hepatotoxicity[J]. *React Oxyg Species*, 2018, 5(15): 145-158.
- [27] YAN M, HUO Y, YIN S, et al. Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions [J]. *Redox Biol*, 2018, 17(2): 274-283.
- [28] 王昭昕,翟玉霞,于英莉,等. 补骨脂素对大小鼠肝CYP450酶4种亚型表达的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(9): 733.

[责任编辑 张丰丰]