

提取溶剂对何首乌肝细胞毒性的影响

吕旻^{1,2}, 王伽伯², 嵇扬⁵, 赵艳玲², 马致洁², 李奇²,

邹正升⁴, 梁庆生⁴, 滕光菊⁴, 鄢丹², 张萍², 肖小河^{3*}, 喻长远^{1*}

- (1. 北京化工大学, 北京 100029; 2. 解放军 302 医院全军中医药研究所, 北京 100039;
3. 解放军 302 医院中西医结合肝病诊疗与研究中心, 北京 100039;
4. 解放军 302 医院非感染肝病研究中心, 北京 100039;
5. 总后药品仪器检验所药理实验室, 北京 100071)

[摘要] 目的: 比较不同溶剂提取何首乌对肝细胞毒性的差异, 探讨提取方式对何首乌安全性的影响。方法: 制备不同提取方式的何首乌样品, 均按生药量的 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 给药, 以 CCK-8 法检测人肝细胞 (L02 细胞) 抑制率为评价指标, 考察提取溶剂, 溶剂量和提取时间 3 个因素对何首乌肝细胞毒性的影响。同时建立何首乌的 UPLC 指纹图谱, 采用偏最小二乘法 (PLS) 回归分析肝细胞毒性与化学成分之间的关系。结果: 建立了基于 CCK-8 比色的何首乌对人正常肝细胞毒性的检测方法。何首乌 75% 乙醇提取物的肝细胞毒性显著 > 水提取 ($P < 0.01$)。进一步正交试验显示, 乙醇浓度对何首乌肝细胞毒性具有显著性影响 ($P < 0.01$), 提取物肝细胞毒性顺序: 50% 乙醇提取物 > 75% 乙醇提取物 > 95% 乙醇提取物。通过偏最小二乘法回归分析, 发现了 2 个与毒性密切相关的色谱峰。结论: 不同提取溶剂对何首乌肝细胞毒性有较大影响, 50% 乙醇提取物毒性最强, 而何首乌泡酒主要采用 50 度左右的白酒, 提示何首乌泡酒服用的方式可能有较大肝损害风险, 应予以高度重视。

[关键词] 何首乌; 肝损害; CCK-8 法; 人肝细胞; 谱-效相关

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)20-0268-05

[doi] 10.11653/syfy2013200268

Influence of Extracting Solvent on Hepatocytes Toxicity of *Polygonum multiflorum*

LV Yang^{1,2}, WANG Jia-bo², JI Yang⁵, ZHAO Yan-ling², MA Zhi-jie², LI Qi², ZOU Zheng-sheng⁴,
LIANG Qing-sheng⁴, TENG Guang-ju⁴, YAN Dan², ZHANG Ping², XIAO Xiao-he^{3*}, YU Chang-yuan^{1*}

- (1. Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China;
2. China Military Institute of Chinese Medicine, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China;
3. Integrative Medical Center for Liver Diseases, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China;
4. Department of Non-Infectious Liver Diseases, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China;
5. Pharmacologic Laboratory, PLA Institute for Drug and Instrument Control, Beijing 100071, China)

[Abstract] **Objective:** The difference of extracting solvent to hepatocytes toxicity of *Polygonum multiflorum* was researched to probe the influence of different usages to the safety of *P. multiflorum*. **Method:** The inhibition rate of *P. multiflorum* samples to human hepatocytes (L02 cell line) with different extracting methods was detected by CCK-8 method. The dose of all the samples was $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ counted on the quantity of crude material. The influence of extracting solvent, the amount of solvent and extracting duration on hepatocytes toxicity

[收稿日期] 20130304(020)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274026, 30973947); 国家公益性行业科研专项(201207002); 国家科技支撑计划课题(Nos. 2012BAI29B02)

[第一作者] 吕旻, 硕士研究生, 从事中药质量生物评价研究, Tel: 010-66933325, E-mail: xiaotian163@126.com

[通讯作者] * 肖小河, 博士, 研究员, 从事中药品质与药性评价研究, Tel: 010-66933325, E-mail: pharmacy302@126.com

喻长远, 博士, 教授, 从事中药新药研究开发, Tel: 010-64448589, E-mail: yeyy@mail.buct.edu.cn

was investigated by orthogonal test. UPLC fingerprints of the *P. multiflorum* samples were acquired and then analyzed with relationship to hepatocytes toxicity by partial least squares (PLS) analysis. **Result:** The method to detect the hepatocytes toxicity of *P. multiflorum* was established based on the CCK-8 colorimetry. The hepatocytes toxicity of the sample extracted with 75% ethanol was much greater than that of the sample extracted with water. The concentration of ethanol investigated in orthogonal test revealed significant influence to the hepatocytes toxicity, and the toxicity sequence of the samples was: 50% ethanol > 75% ethanol > 95% ethanol. According PLS analysis there are two contents relative to hepatocytes toxicity. **Conclusion:** The extracting solvent showed significant influence on the hepatocytes toxicity of *P. multiflorum* and the sample extracted with 50% ethanol was of much toxic potential. It should be cautious about the high risk of liver damage of *P. multiflorum*, considering people usually used the herb by soaking with wine around 50 degree.

[**Key words**] *Polygonum multiflorum*; liver damage; CCK-8 method; human hepatocytes; spectrum-efficient correlation

何首乌始载于《开宝本草》,是常用传统补益类中药^[1]。近年来,随着何首乌及其相关制剂(首乌片、首乌丸、首乌汁和首乌粉等)在抗衰老、乌须发、降血脂等方面的广泛应用^[2-3],有关何首乌导致肝损害的报道日益增多^[4-8]。笔者调研 302 医院药源性肝损害医学数据库,发现有关何首乌及其制剂引发的药源性肝损害病例 21 例,占全部 1 980 例药物肝损害病例的 1.06% (频数排第 15 位),占全部中药肝损害病例的 5.69% (频数排第 2 位)。

何首乌作为保健药物使用时,常采用泡酒及泡水 2 种方法^[9],其中泡酒一般使用高度白酒,泡水有代茶饮及水煎服等方法。然而不同的使用方法对何首乌肝损害是否有影响尚有待深入研究。因此,本文制备了不同提取方式的何首乌样品,并建立何首乌肝细胞毒性检测方法,考察不同提取方式对何首乌肝细胞毒性的影响,同时与指纹图谱进行相关分析,初步探索何首乌可能的肝毒性成分。

1 材料

1.1 药物与试剂 乙醇(北京化工厂,批号 20111013),纯水,甲醇(色谱纯,Fisher,批号 122250),乙腈(色谱纯,Fisher,批号 116525),RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司,批号 1161726),胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号 505985),Cell Counting Kit-8(日本同仁化学研究所,批号 EW728),没食子酸(批号 11081-200302)、二苯乙烯苷(批号 110844-201109)、大黄素(批号 110756-200110)购自中国药品生物制品检定所。何首乌(批号 10050904)购于北京绿野药业有限公司,经解放军第三〇二医院肖小河研究员鉴定为蓼科植物何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb.)的干燥块根。

1.2 仪器 Waters Acquity UPLC 型超高效液相色谱

仪(美国 Waters 公司),Synergy™ HT 型多功能酶标仪(美国 Bio Tek 公司),TC10™ 型自动细胞计数器(美国 Bio-Rad 公司),AL204 型微量分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司),KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司),ZK-82B 型真空干燥箱(上海市实验仪器总厂),恒温二氧化碳培养箱(美国 Napco 公司)。

1.3 细胞系及培养条件 人正常肝细胞 L02 细胞系购自中国典型培养物保藏中心,在含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,37 ℃,5% CO₂ 进行常规培养,实验均在细胞生长对数期进行。

2 方法

2.1 何首乌不同提取物的制备

2.1.1 不同提取溶剂样品的制备 将何首乌粉碎成粗粉,取 2 份何首乌,每份 10 g,置 250 mL 锥形瓶中,分别加入 10 倍量 75% 乙醇及水,超声提取 30 min,减压回收溶剂,真空干燥,制得干浸膏,计算得率,干浸膏备用。

2.1.2 正交试验设计 取 9 份何首乌,每份 10 g,置 250 mL 锥形瓶中,按正交试验因素水平表(表 1)中实验条件,进行超声提取,减压回收溶剂,真空干燥,制得干浸膏,计算得率,以人肝细胞毒性为评价指标,考察乙醇浓度(V/V)、溶剂量、提取时间对何首乌毒性的影响。

2.2 何首乌肝细胞毒性检测 CCK-8 法用于细胞增殖和毒性分析已在国内外得到广泛认可^[10-11],CCK-8 试剂可被细胞中的脱氢酶还原为具有高度水溶性的黄色甲臞染料,生成的甲臞的量与活细胞的数量成正比。该法操作简便,重复性好,灵敏度高,并且对细胞几乎没有毒性。取不同提取方法的何首

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平

水平	因素			误差项
	A 提取溶剂	B 溶剂量/倍	C 提取时间/min	
1	50% 乙醇	5	15	1
2	75% 乙醇	10	30	2
3	95% 乙醇	15	60	3

乌样品干浸膏,以培养液配置成 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (以生药量计) 药液, $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤。将 L02 细胞以 3.5×10^4 个/mL 的密度接种 $200 \mu\text{L}$ 于 96 孔板上,培养 24 h 后,吸弃培养液,加入何首乌药液 $200 \mu\text{L}$,每个样品重复 6 孔,反应 24 h 后,吸弃何首乌药液,加入 5% CCK-8 $100 \mu\text{L}$,培养箱内反应 30 min 后检测 450 nm 处吸光度(A),计算细胞抑制率。

$$\text{抑制率} = (1 - A_{\text{样品}}/A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

2.3 何首乌指纹图谱测定方法

2.3.1 色谱条件 Waters CSH C_{18} 分析色谱柱 ($100 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}, 1.7 \mu\text{m}$), 柱温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

流动相组成:A 相为乙腈, B 相为 0.05% 磷酸-水,梯度洗脱程序: $0 \text{ min}, 5\% \text{ A}$; $5 \text{ min}, 25\% \text{ A}$; $7 \text{ min}, 35\% \text{ A}$; $8 \text{ min}, 45\% \text{ A}$; $9 \text{ min}, 45\% \text{ A}$; $11 \text{ min}, 60\% \text{ A}$; $13 \text{ min}, 65\% \text{ A}$ 。流速 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 254 nm , 进样量 $5 \mu\text{L}$ 。

2.3.2 对照品溶液的配制 精密称取大黄素、没食子酸和二苯乙烯苷对照品适量,分别置于 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇 10 mL 超声溶解,放冷,补加甲醇至刻度,摇匀, $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤即得对照品溶液。

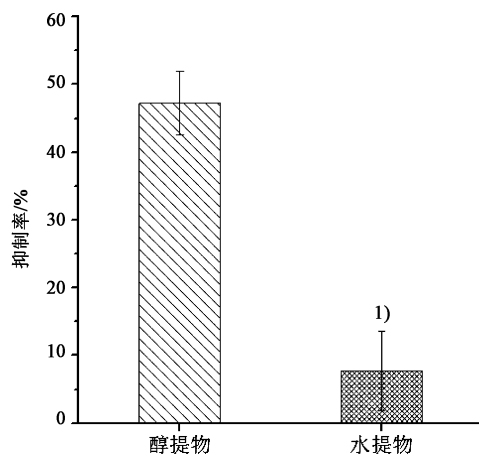
2.3.3 供试品溶液的配制 取正交试验 9 组何首乌样品干浸膏适量,精密称定,置于 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇 10 mL ,超声溶解,放冷,补加甲醇至刻度,摇匀, $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤,配置成 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (以生药量计) 的供试品溶液。

2.3.4 相关分析 采用 SIMCA-P + 12.0.1 统计软件进行偏最小二乘法 (PLS) 回归分析,通过比较各色谱峰的标准化回归系数的大小与正负分析指纹图谱色谱峰与肝细胞毒性的相互关系, $\text{VIP} > 1$ 为有统计学意义^[12]。

3 结果

3.1 不同提取溶剂何首乌样品的肝细胞毒性 对水及 75% 乙醇提取的何首乌样品进行肝细胞毒性比较发现,醇提物毒性显著高于水提物毒性,见图 1。

3.2 正交试验结果 正交试验结果表明,各因素对肝细胞毒性的重要性次序为:提取溶剂 > 溶剂量 >



与醇提物比较¹⁾ $P < 0.01$

图 1 不同提取溶剂何首乌样品肝细胞毒性差异 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

提取时间,其中提取溶剂以第 1 水平影响最大,溶剂量以第 3 水平影响最大,提取时间以第 3 水平影响最大。方差分析结果表明,只有提取溶剂对实验结果有显著性影响 ($P < 0.01$),溶剂量和提取时间无显著性差异。见表 2,3。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果

No.	A	B	C	D	肝细胞抑制率/%
1	1	1	1	1	60.2
2	1	2	2	2	59.9
3	1	3	3	3	71.07
4	2	1	2	3	44.74
5	2	2	3	1	45.98
6	2	3	1	2	48.88
7	3	1	3	2	10.61
8	3	2	1	3	10.5
9	3	3	2	1	19.72
K_1	63.723	38.517	39.860	41.967	
K_2	46.533	38.793	41.453	39.797	
K_3	13.610	46.557	42.553	42.103	
R	50.113	8.040	2.693	2.306	

注: K_i 为任意列水平为 i 的结果的均值, R 为极差。

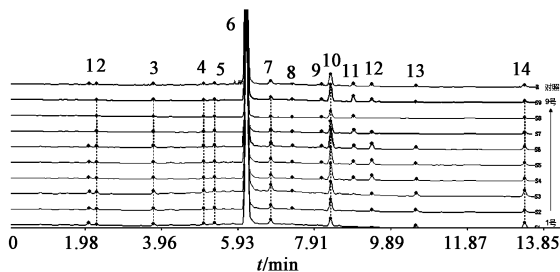
3.3 UPLC 指纹图谱分析 根据色谱条件,建立 9 组正交试验何首乌样品的指纹图谱,共得到 14 个指纹峰,将对照品溶液按同样的条件进行分离,进行色谱峰归属,见图 2。

3.4 相关分析 何首乌不同提取物的指纹图谱与肝细胞毒性进行 PLS 回归分析,采用多种交叉验证法当提取主成分为 3 时,模型对 X, Y 的解释能力分别为 0.93 和 0.994,交叉有效性 Q^2 为 0.973,说明

表3 L₉(3⁴) 正交试验方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	3 890.788	2	387.220	<0.01
B	124.987	2	12.439	
C	11.003	2	1.095	
D(误差)	10.048	2	1.000	
总计	4036.826	8		

注: $F_{0.01}(2,2) = 99.0$, $F_{0.05}(2,2) = 19.0$ 。



2. 没食子酸; 6. 二苯乙烯苷; 14. 大黄素

图2 何首乌不同提取物的指纹图谱

模型具有良好的预测能力。其中3号峰和13号峰的标准回归系数最大,分别为0.205和0.209。这两个峰的峰面积变化也较大($RSD > 15$),更为重要的是3号峰和13号峰的峰面积变化与肝细胞毒性的变化呈正相关。PLS回归的标准回归系数也证明了这一点。因此3号峰和13号峰与肝细胞毒性相关性较强,但其结构需进一步成分指认。

4 讨论

何首乌与灵芝、人参、冬虫夏草历来并称为祖国草药中的“四大仙草”,在民间流传为补肝肾、乌须发、乃至长生不老的仙药,在一定程度上夸大了何首乌的功效,而其可能引发肝损害的风险却常被忽略。何首乌导致肝损害可能有多种原因,如未辨证用药、药物使用过量、药材质量不合格、使用方法不当、患者个体差异等。本研究比较了何首乌不同溶剂提取物对肝细胞毒性的差异,探讨服用方式对何首乌安全性的影响。笔者前期调研发现,相当数量的何首乌肝中毒患者是通过网络购药。笔者网购的30批制何首乌中约2/3不符合制何首乌要求,其肝细胞毒性接近生何首乌。考虑到这一实际情况,本文以生何首乌作为研究对象。

本研究建立了基于CCK-8比色的何首乌对人正常肝细胞毒性的检测方法,CCK-8法检测的A值与活细胞数的线性相关度要优于常用的MTT法,是一种灵敏度较高、重复性好的细胞活性检测方法^[13],能够快速、简便的对何首乌的肝细胞毒性进

行早期评价。

本研究发现,不同提取溶剂提取对何首乌肝细胞毒性有较大影响,乙醇提取物的毒性>水提物,其中50%乙醇提取物毒性最强。检索文献发现,2005年到2012年有7例患者因服用何首乌药酒引发肝损害^[14-17],302医院也有收治服用何首乌药酒引发肝损害病例;而何首乌泡酒主要采用高度白酒(一般在50度左右),与本文发现的50%乙醇提取物肝细胞毒性最强的结果基本吻合,提示何首乌泡酒可能有较大的引发肝损害风险,应予以高度重视。

研究中药活性/毒性作用与化学成分的相关性是研究中药有效/毒性成分的方法之一^[18-19],偏最小二乘法(PLS)回归允许在样本数少于变量数的条件下进行回归建模,因而适用于中药指纹图谱小样本分析^[20]。本文将不同提取方法何首乌的UPLC指纹图谱与何首乌对人肝细胞的毒性进行PLS回归分析,发现了2个与肝细胞毒性相关性较大的成分,其结构还需进一步研究。此外,本文采用正常人肝细胞检测的细胞抑制率与临床肝损害具有较密切的相关性,但体外肝细胞培养与体内肝细胞在药物转化、免疫应答、炎症反应等方面还存在一定的差异,故在进一步筛选确认何首乌肝毒性物质时还需体内实验验证。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:164.
- [2] 佟海宁, 刘丽君. 何首乌的药理研究与临床应用[J]. 亚太传统医药, 2011, 7(11):166.
- [3] 杨丽娟. 从古方配伍探何首乌在乌发、生发中的应用[J]. 河南中医, 2008, 28(9):87.
- [4] Jung K A, Min H J, Yoo S S, et al. Drug-induced liver injury: twenty five cases of acute hepatitis following ingestion of polygonum multiflorum thunb[J]. Gut and Liver, 2011, 5(4):493.
- [5] 徐静, 汪茂荣, 何长伦, 等. 口服何首乌致肝损害40例临床分析[J]. 东南国防医药, 2009, 11(3):209.
- [6] 刘国强. 何首乌致肝损害9例临床分析[J]. 当代医学, 2009, 15(30):149.
- [7] 李剑. 中药何首乌致药物性肝炎11例临床分析[J]. 内蒙古中医药, 2010, 29(21):89.
- [8] 王君明, 崔瑛, 申玲玲, 等. 中药致药源性肝损伤的氧化应激机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5):247.
- [9] 鄢良春, 赵军宁, 邱雄. 何首乌安全性问题研究进展[J]. 中药药理与临床, 2009, 25(3):77.

- [10] Huang Jian, Zheng Da-Li, Qin Feng-Song, et al. Genetic and epigenetic silencing of SCARA5 may contribute to human hepatocellular carcinoma by activating FAK signaling[J]. J Clin Invest, 2010, 120(1):223
- [11] Jie Ding, Shenglin Huang, Shunquan Wu, et al. Gain of miR-151 on chromosome 8q24.3 facilitates tumour cell migration and spreading through downregulating RhoGDI A[J]. Nat Cell Biol, 2010,12(4):390
- [12] 贾伟. 医学代谢组学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2011:212.
- [13] 熊建文,肖化,张镇西. MTT法和CCK-8法检测细胞活性之测试条件比较[J]. 激光生物学报,2007,16(5):559.
- [14] 谢先吉,马葵芬,刘莹. 何首乌致肝损伤病例分析[J]. 药品评价,2012,9(32):36.
- [15] 郭熙清. 何首乌致肝损害的临床特点分析[J]. 中国社区医师;医学专业,2012,14(4):416.
- [16] 张艳,田丰,王志毅. 何首乌致药物性肝损伤的临床特点分析[J]. 检验医学与临床,2012,9(18):2328
- [17] 李智. 何首乌致肝损害 2 例[J]. 中国误诊学杂志,2006,6(10):2033.
- [18] 张磊,聂磊,王唯红. 黄芪注射液色谱指纹图谱与抗氧化作用的相关分析[J]. 中药材,2009,32(11):1757.
- [19] 陈晓萌,陈畅,李德凤,等. 中药有效成分辨识的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):249.
- [20] 王惠文. 偏最小二乘回归方法及其应用[M]. 北京:国防工业出版社,1999:200.
- [责任编辑 李玉洁]

《中国中药杂志》2014 年征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。创刊于 1955 年 7 月,是创刊最早、发行量最大的中药学术刊物。《中国中药杂志》全面反映我国中医科研最高学术水平,主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良反应、临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、药事管理、经验交流、信息等栏目。主要读者对象为医药领域各级管理部门、研究所、大专院校、企业以及医院等从事医药科研、管理、生产、医院制剂及临床研究等方面的专业人员。

《中国中药杂志》现为半月刊,128 页,2014 年定价每期 30 元,全年 24 期定价为 720 元。国内刊号 11-2272/R,国际刊号 1101-5302。

本刊现已全面实现网络编辑办公,如欲投稿或联系本刊、获取本刊各种信息动态请登录中国中药杂志网站 www.cjcm.com.cn 或 www.中国中药杂志.com。

联系电话:稿件查询 010-64045830 转 602;主任电话 010-64058556;资源与栽培栏编辑:010-64048925;制剂栏编辑:010-64040392;化学栏编辑:010-64040113;药理栏编辑:010-84022522;临床栏编辑:010-64059766;电子杂志制作发行及网上维护:010-64030625。