

· 毒理 ·

吴茱萸水提组分对大鼠长期毒性研究

黄伟, 孙蓉*

(山东省中医药研究院, 济南 250014)

[摘要] **目的:**观察连续 35 d 给大鼠吴茱萸水提组分样品导致大鼠长期毒性损伤程度及恢复情况。**方法:**分别给大鼠灌胃高、中、低剂量的吴茱萸水提组分样品连续 35 d,按生药量计算,分别为 8.0,4.0,2.0 g·kg⁻¹,除观察一般状况外,检测血常规、血清肝功能、肾功能、脂质代谢、糖代谢相关指标,处死大鼠,称取心、肝、脾、肺、肾脏质量,计算脏、体比值,进行肝脏病理组织学检查。剩余大鼠停止给药,恢复 20 d,观察大鼠恢复情况,并进行上述相同指标的检测。**结果:**不同剂量的吴茱萸水提组分样品在连续给药 35 d 后可导致大鼠体重下降,饮食、饮水不佳,导致血中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总蛋白(TP)水平明显增高,白蛋白(ALB)明显降低,白蛋白/球蛋白(A/G)降低,肝脏质量和肝体比值增大,病理学检查可见不同程度的肝组织损伤;上述变化随剂量的增加而逐渐加重,与空白组比较有明显差异($P < 0.01$)。对总胆红素(TBI)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、血糖(Glu)、胆固醇(CHO)等指标和血常规影响不明显;肝毒性损伤程度与用药剂量呈一定的剂量依赖相关性。恢复期大鼠上述各指标只见高剂量组 ALT 指标与空白组比较有显著性差异($P < 0.05$),其余指标未见显著性差异。**结论:**长时间给予一定剂量的吴茱萸水提组分可造成对大鼠明显的蓄积毒性,其毒性损伤部位以肝损伤为主,经过 25 d 恢复期观察,其脏器损伤基本可恢复。

[关键词] 吴茱萸水提组分; 大鼠; 长期毒性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0269-05

[doi] 10.11653/syjf2013080269

Study on Chronic Toxicity of Water Extraction Components from Evodia Fructus in Rats

HUANG Wei, SUN Rong*

(Shandong Research Academy of Traditional Chinese Medicine, Shandong Ji'nan 250014, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the chronic toxicity damage of the water extraction components from Evodia Fructus in rats. **Method:** The water extraction components with different doses from Evodia Fructus were separately orally given to rats, and the high, middle and low dose-group were separately 8.0, 4.0, 2.0 g·kg⁻¹ calculated by crude herbs, the general conditions were observed and the related indexes were detected, such as the routine control of blood, hepatic function, renal function, the metabolism condition of lipids and the glycometabolism indexes; the rats were dissected and precisely weigh the weight of heart, liver, spleen, lung, renal, and calculated the ratio of organ to body; the histopathologic examination of hepatic tissue were examined. The remaining rats were not administrated, and recovered for 20 days, the recovery condition of rats were observed, and the above indexes were detected. **Result:** The water extraction components from Evodia Fructus with different doses could induce the body weight decreasing in rats, the level of alanine aminotransferase (ALT), aspartate

[收稿日期] 20120721(002)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2009CB522802);山东省科技平台建设项目课题(2008GG2NS02021)

[第一作者] 黄伟, 硕士, 研究实习员, 从事中药药理与毒理研究

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

aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and total protein (TPC) serum obviously increased, albumin (ALB) and the ratio of ALB to GLB in serum obviously decreased, the liver weight and the ratio of liver to body increased, and the hepatic tissue damage was obvious in the histopathologic examination of hepatic tissue; the above-mentioned changes gradually aggravated with dose increasing, and it was the obvious discrepancy compared with control group. The influence on the content of total bilirubin (TBI), blood urea nitrogen (BUN), glucose (GLU), total cholesterol (CHO) and creatinine (Cr) was not obvious, and the hepatic toxicity degree had certain dose independence relationship. The ALT level of high dose group in the above indexes of recovered rats had significant difference compared with control group, and the other indexes had no significant difference.

Conclusion: The long term administration of water extraction components from *Evodia Fructus* at the certain dose in rats could induce obvious cumulative toxicity, and the mainly toxic injury sites were in liver, but after recovery period observation, the toxicity was basically recovered.

[**Key words**] water extraction components of *Evodia Fructus*; rat; chronic toxicity

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss) Benth.、石虎 *Evodia rutaecarpa* (Juss) Benth Var. *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss) Benth. Var. *bodiner* (Dode) Huang. 的干燥近成熟果实。辛、苦、热,有小毒。归肝、脾、胃、肾经,能散寒止痛,降逆止呕,助阳止泻^[1],为温中止痛的必备药。近年来,国内外学者对吴茱萸的化学成分和药理作用等方面进行了深入研究。吴茱萸主要含有生物碱、挥发油、苦味素等化学成分^[2-3],具有广泛的药理作用^[4]。其中生物碱是吴茱萸的主要有效成分^[5],而吴茱萸次碱是生物碱中最主要的活性成分^[6-8],对于吴茱萸及其复方的药理作用研究已经进行到了分子和基因水平^[9],然而有关吴茱萸毒性的研究报道却很少。临床上曾有服用吴茱萸过量致死的报道,并在血中检测出了吴茱萸生物碱^[10]。作者前期已经证实了吴茱萸药材不同提取液均具有一定的急性毒性,解剖观察以肝毒性为主^[11]。考虑到吴茱萸水提液为临床常用剂型,且具有反复给药的特点,故结合前期研究基础,本实验对吴茱萸水提组分组长期服用对大鼠可能导致的蓄积毒性进行了实验研究,以进一步确定毒性靶器官,明确其临床安全用药的剂量范围,以期为临床安全、有效使用吴茱萸提供实验依据。

1 材料

1.1 药品 吴茱萸药材购自安徽亳州市鲁康药材站(批号 20090617),经山东省中医药研究院林惠彬研究员鉴定为芸香科植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss) Benth 的干燥近成熟果实,按 2005 年版《中国药典》吴茱萸项下检查,符合各项规定。吴茱萸水提组分组(批号 20090709),由本试验室提取制备,临用时用蒸馏水稀释成所需浓度。

吴茱萸水提组分组样品制备:取吴茱萸药材 1 500 g,分别加 10,8,8 倍量水加热回流提取 3 次,每次 1 h,16 层纱布滤过、合并滤液,浓缩至所需浓度。

1.2 动物 Wistar 大鼠,雌雄各半,体重 150 ~ 180 g,适龄、健康,清洁级,共 80 只,购自山东大学实验动物中心,动物许可证号 SCXK(鲁)20090001。

1.3 仪器与试剂 德国贝尔 560 全自动生化分析仪,UV2100 紫外分光光度计,血常规自动分析仪,常规病理检测仪器,HH-S 恒温水浴锅,高速离心机。天冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒(批号 20091027),丙氨酸转氨酶(ALT)试剂盒(批号 20091027),碱性磷酸酶(AKP——试剂盒(批号 20090915),白蛋白(ALB)试剂盒(批号 20090915),总胆红素(TBI)试剂盒(批号 20090915),肌酐(Cr)试剂盒(批号 20091027),尿素氮(BUN)试剂盒(批号 20091027),总蛋白(TP)试剂盒(批号 20091027),葡萄糖(Glu)试剂盒(批号 20091027)均购自南京建成生物工程研究所;胆固醇(CHO)试剂盒(批号 006301)购自长春汇力生物科技有限公司。

2 方法

2.1 动物分组 大鼠 80 只,雌雄各半,体重 150 ~ 180 g,按体重随机分为 4 组:空白对照组、吴茱萸水提组分组高、中、低剂量组,每组 20 只。

2.2 剂量设计 根据吴茱萸水提组分组的经口急性毒性试验结果给出 LD₅₀,设定吴茱萸水提组分组高、中、低剂量组分别为 8.0,4.0,2.0 g·kg⁻¹,各组均按 10 mL·kg⁻¹ 体积 ig,空白对照组给等体积蒸馏水 ig。每日给药 1 次,按体重定量给药。设定连续给药 35 d,恢复期为 20 d。

2.3 观察方法 上述大鼠试验前稳定 7 d,观察一般状况:体重、进食、粪便、活动等情况均无异常,按

每组 20 只,每笼 5 只,然后开始进入实验。根据给药后大鼠毒性症状和死亡情况,每 5 d 进行体重、日食量、日水量的变化;逐只记录、观察体重、进食、尿液、粪便、活动和死亡等情况。

2.4 观察指标 大鼠于给药 35 d 和恢复期 20 d 后,药后 24 h(禁食不禁水 12 h),眶静脉采抗凝血,振匀后,用全自动血球分析仪进行检测血常规;取自凝血分离血清,用相关试剂盒,全自动生化分析仪,测定血生化指标;处死动物,取心、肝、脾、肺、肾脏称重,计算脏/体比值,快速取肝,然后送检 HE 常规染色的病理组织学检查。

2.5 统计学方法 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件对各组参数进行单因素方差分析,计量资料采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 有显著性差异。

3 结果

3.1 一般情况观察 在 35 d 给药期内,空白对照

组大鼠一般活动正常、毛色光亮、进食饮水均正常、未见粪尿的异常改变,且无一死亡。吴茱萸水提组分样品高、中、低剂量组大鼠呈现不同程度的行为倦殆、欠活泼,毛色无光、稀松、掉毛等,进食、饮水欠佳,无死亡,35 d 实验期内,高、中剂量组出现 8 只怠动,6 只毛色不滑,8 只少食,低剂量出现 7 只怠动,3 只毛色不滑,1 只少食;恢复 20 d 后上述症状高剂量组 8 只完全恢复,中、低剂量组基本全部恢复。吴茱萸水提组分样品高剂量组雄性大鼠体重于药后 5 d 与正常组比较呈显著性差异;药后 35 d 高、中、低剂量组与正常组比较均呈现不同程度的显著性差异;各剂量组停止给药,恢复 5 d ~ 20 d 后,雄性大鼠体重逐渐恢复,与正常组比较,无统计学意义。吴茱萸各剂量组雌性大鼠体重给药期间与正常组比较均未见统计学意义。在 35 d 给药期和恢复期 5 d 内对雌性大鼠体重影响见表 1。

表 1 吴茱萸水提组分样品对药后和恢复期雄性大鼠长毒实验体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	药前体重	药后 5 d	药后 10 d	药后 15 d
空白	-	171.7 ± 6.6	195.7 ± 5.6	229.7 ± 12.3	250.4 ± 15.5
吴茱萸水提组分	8.0	170.9 ± 6.7	190.5 ± 5.1 ¹⁾	215.0 ± 12.0 ¹⁾	217.6 ± 22.6 ²⁾
	4.0	170.7 ± 5.4	188.3 ± 14.4	214.3 ± 17.5 ¹⁾	231.8 ± 32.6
	2.0	170.2 ± 7.5	202.7 ± 14.8	221.6 ± 13.7	238.7 ± 20.6

组别	剂量/g·kg ⁻¹	药后 20 d	药后 25 d	药后 30 d	药后 35 d	恢复 5 d
空白	-	270.7 ± 13.2	293.5 ± 12.2	314.8 ± 19.3	332.8 ± 16.0	347.4 ± 20.7
吴茱萸水提组分	8.0	235.2 ± 19.4 ³⁾	252.0 ± 20.6 ³⁾	276.4 ± 24.7 ²⁾	309.6 ± 27.6 ¹⁾	335.1 ± 16.0
	4.0	251.7 ± 40.3	272.4 ± 37.4	279.5 ± 49.1 ¹⁾	301.7 ± 56.6	328.0 ± 51.4
	2.0	251.8 ± 37.4	272.6 ± 23.7 ¹⁾	295.6 ± 21.1 ¹⁾	299.3 ± 48.7	305.2 ± 46.6

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ (表 2 ~ 5 同)。

3.2 血常规检查 结果显示,药后 35 d 和恢复期 20 d,吴茱萸水提组分样品高、中、低剂量组对血常规指标无明显影响,与空白对照组比较无显著性差异。

3.3 血生化指标检查 白对照组大鼠血清各指标水平均在正常范围内。吴茱萸水提组分高、中、低剂量组用药 35 d 后均可使大鼠血 ALT,AST 水平明显增高,ALB 水平明显降低,与空白对照组比较均有不同程度的显著性差异。吴茱萸水提组分高剂量组还可使大鼠血清 TPC 含量显著升高,与空白组比较有非常显著性差异($P < 0.01$)。其余指标与空白组比较均无显著性差异。提示吴茱萸水提组分慢性毒性损伤部位主要在肝脏。见表 2。

经过 20 d 恢复期后,只有吴茱萸水提组分高剂量组大鼠 ALT(69.4 ± 20.2) U·L⁻¹与空白对照组(53.9 ± 9.1) U·L⁻¹比较有显著性差异($P < 0.05$),

其余各剂量组指标与空白对照组比较无显著性差异。提示上述生化学指标的异常变化在停药后基本可复,未见其他明显的后遗效应和继发毒性变化。

3.4 重要脏器质量及脏体比值测定 解剖大鼠,全面细致观察心、肝、脾、肺、肾脏大小、形态、色泽、质感的变化,并注意有无器官充血,水肿粘连和包块。精密称取脏器质量,计算其脏/体,结果进行组间 *t* 检验。见表 3。

表 3 结果显示,药后 35 d,吴茱萸水提组分高、中、低剂量组的大鼠肝体比值与空白对照组比较分别有极显著性($P < 0.001$)、非常显著性($P < 0.01$)和显著性差异($P < 0.05$),其他大鼠脏器系数与正常对照组大鼠脏器比较无显著性差异。

经过 20 d 恢复期后,吴茱萸水提组分各剂量组大鼠心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、胸腺、睾丸、附睾、子宫、卵巢、脑脏器系数与空白对照组比较均无显著性

表 2 吴茱萸水提组分对药后 35 d 大鼠长期毒性实验血生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

生化指标	空白对照组	吴茱萸水提组分		
		8 g·kg ⁻¹ 组	4 g·kg ⁻¹ 组	2 g·kg ⁻¹ 组
ALT/U·L ⁻¹	69.7 ± 8.6	108.5 ± 31.5 ²⁾	88.2 ± 15.6 ²⁾	82.2 ± 11.1 ¹⁾
AST/U·L ⁻¹	205.8 ± 23.1	256.1 ± 33.6 ²⁾	238.8 ± 36.8 ¹⁾	238.5 ± 41.1 ¹⁾
ALP/U·L ⁻¹	215.8 ± 41.5	227.4 ± 30.8	240.0 ± 31.5	260.3 ± 59.4
TPC/g·L ⁻¹	72.5 ± 5.0	80.7 ± 4.3 ²⁾	73.9 ± 4.6	74.9 ± 5.7
ALB/g·L ⁻¹	32.3 ± 1.9	29.4 ± 3.6 ¹⁾	29.7 ± 2.6 ¹⁾	29.6 ± 2.9 ¹⁾
TBL/U	0.77 ± 0.22	1.04 ± 0.42	0.79 ± 0.33	0.59 ± 0.34
CHO/mmol·L ⁻¹	1.93 ± 0.31	1.98 ± 0.30	1.90 ± 0.18	1.77 ± 0.22
GLU/mmol·L ⁻¹	8.32 ± 1.04	8.07 ± 1.78	7.83 ± 1.57	8.66 ± 2.07
BUN/mmol·L ⁻¹	8.62 ± 1.04	9.41 ± 0.87	9.18 ± 0.99	9.14 ± 1.89
CRE/μmol·L ⁻¹	59.6 ± 4.9	55.5 ± 6.5	58.1 ± 7.7	55.0 ± 9.0

表 3 吴茱萸水提组分对大鼠长期毒性实验脏器系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

g·(100 g)⁻¹

脏器	空白对照组	吴茱萸水提组分		
		8 g·kg ⁻¹ 组	4 g·kg ⁻¹ 组	2 g·kg ⁻¹ 组
心	0.335 ± 0.046	0.311 ± 0.025	0.369 ± 0.080	0.361 ± 0.054
肝	3.068 ± 0.298	3.701 ± 0.364 ³⁾	3.568 ± 0.288 ²⁾	3.452 ± 0.385 ¹⁾
脾	0.217 ± 0.045	0.227 ± 0.084	0.199 ± 0.032	0.260 ± 0.081
肺	0.568 ± 0.073	0.532 ± 0.079	0.776 ± 0.552	0.604 ± 0.095
肾	0.535 ± 0.120	0.528 ± 0.107	0.599 ± 0.201	0.559 ± 0.165
肾上腺	0.014 ± 0.004	0.015 ± 0.005	0.018 ± 0.009	0.014 ± 0.005
胸腺	0.123 ± 0.044	0.155 ± 0.193	0.154 ± 0.053	0.132 ± 0.021
睾丸	0.909 ± 0.057	0.879 ± 0.167	1.047 ± 0.329	0.964 ± 0.091
附睾	0.235 ± 0.045	0.196 ± 0.060	0.288 ± 0.069	0.288 ± 0.091
子宫	0.228 ± 0.105	0.252 ± 0.113	0.242 ± 0.027	0.186 ± 0.050
卵巢	0.049 ± 0.030	0.045 ± 0.013	0.047 ± 0.034	0.046 ± 0.018
脑	0.561 ± 0.058	0.518 ± 0.071	0.601 ± 0.235	0.549 ± 0.100

差异,提示上述脏器系数变化在停药后基本可复,未见其他明显的后遗效应和继发毒性变化。

3.5 重要脏器病理组织学检查 病理组织学检查:肝脏病变明显,经过上述停药 20 d 后恢复期观察,病变程度有所缓解,但不能全部回复;其余组织病理组织学改变不明显,停药 20 d 后也未见明显的后遗和继发性病理改变;肝脏明显病变的病理照片,见图 1~2。

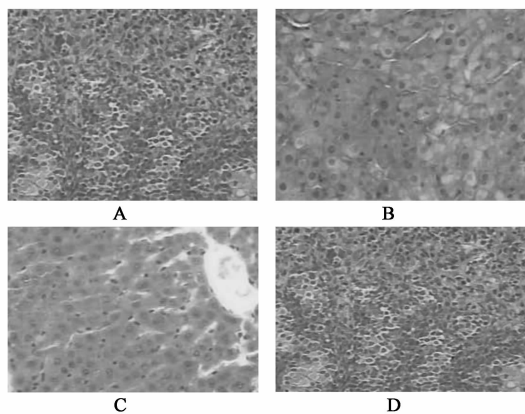
肝脏:正常对照组肝细胞大小一致,排列整齐,未见明显肿胀、坏死及炎症反应。吴茱萸水提组分高剂量给药组大鼠肝脏出现重度浊肿,部分嗜酸性变,并有大的灶性坏死,中、低剂量组不同程度的肝细胞呈现水样变、嗜酸性变并小出血灶、点状坏死、玻璃样变性和单纯水样变或玻璃样变,汇管区血管扩张显著,肝脏间质充血部分细胞水肿,部分细胞溶

解消失,可见小的出血灶。肝脏显微组织增生,呈现一定的纤维变;随着剂量的降低,上述肝脏病变逐渐减轻。

其余脏器病理组织学检查未见明显异常。

4 讨论

古代文献对吴茱萸的毒性早有记载。《别录》言其“大热,有小毒”。《药性论》:“吴茱萸,味苦、辛,大热,有毒”。《本草纲目》记载:吴茱萸“多食伤神,令人起伏气,咽喉不通”,“辛热,走气动火,昏目发疮”,“多食冲眼又脱发也”,“不宜多用恐损元气”,“有小毒,动脾火,病目者忌之”等^[12]。《食疗本草》中记述吴茱萸“肥健人不宜食”^[13]。可见,古人对吴茱萸的毒性已经有一个深刻的认识。临床上因服用了未制透的吴茱萸或直接服用了生品吴茱萸,或因超剂量服用而产生中毒的报道时有发生,笔



A. 空白对照组;B. 吴茱萸水提组分 8 g·kg⁻¹组;
C. 吴茱萸水提组分 4 g·kg⁻¹组;D. 2 g·kg⁻¹组(图 2 同)

图 1 吴茱萸水提组分对药后 35 d 大鼠
长毒实验肝脏组织病理照片

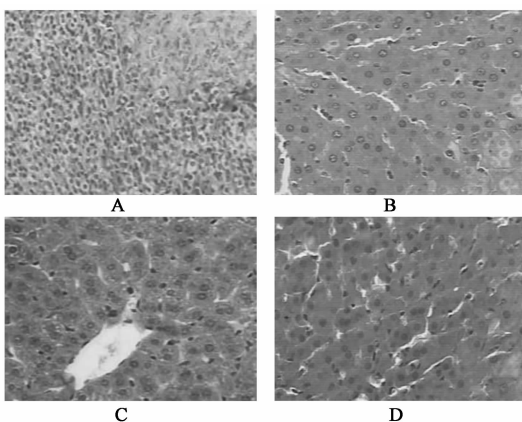


图 2 吴茱萸水提组分恢复 20 d 大鼠长毒实验
肝脏组织病理照片

者在前期的研究中,发现吴茱萸水提组分具有一定的毒性,且以肝毒性损伤为主。考虑到吴茱萸水提液为临床常用剂型,且具有反复给药的特点,并结合前期研究基础,考察了吴茱萸水提组分对大鼠的长期毒性,以期为临床安全有效合理用药提供实验依据,为临床上应用吴茱萸可能的潜在毒性提出预警。

吴茱萸水提组分对大鼠长期毒性实验研究可见:连续 35 d 给予不同剂量的吴茱萸水提组分样品可导致大鼠体重下降,饮食、饮水不佳,血 ALT、AST、AKP、TPC 增高,ALB 降低、A/G 比值降低,肝脏质量和肝体比值增大;对血常规、肾功能影响不明显;肝毒性损伤程度与用药剂量呈一定的剂量依赖相关性。病理检查可见不同程度的肝脏病理组织损伤,高剂量组大鼠肝脏出现重度浊肿,部分嗜酸性

变,并有大的灶性坏死,中、低剂量组不同程度的肝细胞呈现水样变、嗜酸性变并小出血灶、点状坏死、玻璃样变性和单纯水样变或玻璃样变,汇管区血管扩张显著,肝脏间质充血部分细胞水肿,部分细胞溶解消失,可见小的出血灶。肝脏显微组织增生,呈现一定的纤维变;随着剂量的降低,上述肝脏病变逐渐减轻。上述变化随剂量的增加而逐渐加重,呈现一定的剂量依赖关系。对其他指标影响不明显。吴茱萸水提组分对大鼠给药 35 d 造成的慢性毒性损伤部位以肝损伤为主,水提组分在按含生药量计算分别为 2.0 ~ 8.0 g·kg⁻¹ (相当于人用量的 31.2 ~ 124.5 倍)时,可产生明显的毒性损伤,经过 20 d 恢复期观察,仍有部分病变不可逆。这提示我们在临床和生产中安全规范、使用吴茱萸,在临床不良反应监测中要密切关注和定期检查血肝功指标。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:化学工业出版社,2005:160.
- [2] 孟娜,陈凤凰,惠斌,等. 吴茱萸化学成分研究[J]. 贵州大学学报:自然科学版,2006,23(2):188.
- [3] 张恒斌. 吴茱萸化学成分及测定方法研究进展[J]. 中国现代中药,2008,10(11):9.
- [4] 于静华,刘春禹,吕小丹,等. 吴茱萸药理作用研究进展[J]. 吉林中医药,2005,25(2):53.
- [5] 周云波,熊梅,韩俊,等. 吴茱萸的研究进展[J]. 文山师范高等专科学校学报,2008,21(1):102.
- [6] 余奇,郭澄,程泽能. 吴茱萸次碱的研究进展[J]. 药学实践杂志,2007,25(6):353.
- [7] 龙明立,张毅民,贺丽平,等. 吴茱萸次碱的药理学研究进展[J]. 解放军药学报,2008,24(6):528.
- [8] 闵慧,李元建. 吴茱萸次碱的药理作用研究进展[J]. 中南药学,2008,6(4):451.
- [9] 鲁燕侠,蔺兴遥,逯振宇,等. 吴茱萸的化学成分及临床应用[J]. 解放军药学报,2002,18(4):218.
- [10] 蔡雪映,孟楠,杨冰. 服用吴茱萸过量致中毒 1 例分析[J]. 北京中医,2006(3):171.
- [11] 黄伟,赵燕,孙蓉. 吴茱萸不同组分对小鼠急性毒性试验比较研究[J]. 中国药物警戒,2010,7(3):129.
- [12] 明·李时珍. 本草纲目·下册[M]. 北京:人民卫生出版社,1999:1178.
- [13] 唐·孟诜,张鼎. 食疗本草[M]. 北京:人民卫生出版社,1984:21.

[责任编辑 聂淑琴]