

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110303. 1352. 014

## 吴茱萸致小鼠肝毒性时效、量效关系研究

周琦, 张茜, 金若敏\*

(上海中医药大学药物安全评价中心, 上海 201203)

**[摘要]** 目的:研究吴茱萸致小鼠肝毒性的时效、量效关系。方法:将 KM 小鼠随机分为空白组和吴茱萸组,吴茱萸组分为 5 个不同时间组和 3 个不同剂量组。不同时间组动物在连续 ig 吴茱萸水煎液  $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  后于 8, 15, 20, 25, 30 d 处理,不同剂量组以  $100, 50, 25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  连续 ig 8 d 后处理,各组动物均检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸氨基转移酶(AST),计算肝脏指数,并观察肝组织病理学变化。结果:与正常组相比,吴茱萸  $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  能够升高小鼠 ALT, AST 水平、肝脏指数( $P < 0.01$ ),且 ALT, AST 水平在给药后第 20 d 达高峰,ALT 从  $(31.7 \pm 9.1) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$  升高至  $(621.4 \pm 244.9) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ , AST 从  $(120.0 \pm 31.8) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$  升高至  $(407.6 \pm 132.8) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ , 肝脏指数和病理形态学的改变也具有时间依赖性;给予不同剂量的吴茱萸后,小鼠血清 ALT, AST 水平、肝脏指数均有上升,中高剂量组 ALT 分别为  $(127.2 \pm 42.0), (320.0 \pm 131.3) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ , AST 分别为  $(282.1 \pm 69.8), (471.4 \pm 143.7) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ , 与正常组相比 ALT, AST 水平和肝脏指数差异非常显著,病理形态学改变随剂量增大而损伤严重,毒性呈剂量依赖性。结论:小鼠连续 ig 给予吴茱萸水煎液可以造成肝脏的损伤,毒性与时间、剂量呈一定相关性。

**[关键词]** 吴茱萸;肝脏;毒性;量效;时效

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0232-04

## Time-effect and Dose-effect of *Evodia rutaecarpa* on Hepatotoxicity in Mice

ZHOU Qi, ZHANG Qian, JIN Ruo-min\*

(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Center for Drug Safety Evaluation, Shanghai 201203, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the time-effect relation and dose-effect relation of hepatotoxicity induced by *Evodia rutaecarpa* in mice. **Method:** KM mice were divided into control group and model groups. Model groups were divided into 5 different time groups and 3 different dose groups. The different time groups were gavaged with water decoction of *E. rutaecarpa* in doses of  $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  for 8, 15, 25, 30 d and then sacrificed. While the different dose groups were given in dose of  $100, 50, 25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  for 8 days and then sacrificed. All animals were detected for the levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST). The liver index was calculated, and the liver histological changes were investigated. **Result:** Compared with the control group, dose group of  $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  had a high level of serum ALT, AST and liver index ( $P < 0.01$ ). Serum ALT and AST reached a peak after 20 days; ALT from  $(31.7 \pm 9.1) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$  to  $(621.4 \pm 244.9) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ , AST from  $(120.0 \pm 31.8)$  to  $(407.6 \pm 132.8) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$  respectively. Furthermore, the liver index and pathologic change showed time dependance. In the groups of different doses, serum ALT, AST and liver index were all increased. ALT in the medium and high dose groups were  $(127.2 \pm 42.0), (320.0 \pm 131.3) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ , AST were  $(282.1 \pm 69.8), (471.4 \pm 143.7) \text{ U} \cdot$

**[收稿日期]** 20101115(005)

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2009CB522807);国家“重大新药创新”科技重大专项项目(2009ZX0902-002)

**[第一作者]** 周琦,博士在读,专业:中西医结合基础,从事药物肝肾毒性的病理学研究, Tel:021-51323053, E-mail:zhou.qi@sohu.com

**[通讯作者]** \*金若敏,研究员,上海中医药大学药物安全评价研究中心主任, Tel:021-51322401, E-mail:rmj801@126.com

**[网络出版时间]** 2011-03-03 13:52

L<sup>-1</sup>. Compared with the control group, there were significant differences in serum ALT, AST and liver index of the high and medium dose groups, and the liver pathologic examination showed the liver tissue were damaged more seriously with the increased dose in a dose dependence manner. **Conclusion:** When water decoction of *E. rutaecarpa* is given to mice continuously, it may induce liver damage and the hepatotoxicity demonstrated by significant time-effect and dose-effect.

[ **Key words** ] *Evodia rutaecarpa*; liver; toxicity; dose-effect; time-effect

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth、石虎 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实,能散寒止痛,降逆止呕,助阳止泻。主治厥阴头痛,寒疝腹痛,寒湿脚气,经行腹痛,脘腹胀痛,呕吐吞酸,五更泄泻,外治口舌生疮、湿疹等症。临床上曾有报道患者服用吴茱萸后,有中毒症状出现,如患者自觉腹痛、腹泻、视力障碍、错觉、脱发、胸闷、头痛、眩晕、皮疹或出现恶心症状、猩红热样药疹等<sup>[1,2]</sup>。本实验就吴茱萸引起小鼠肝毒性的时效、量效关系进行了初步研究。

## 1 材料

**1.1 动物** KM 小鼠,清洁级,雌雄各半,体重 18 ~ 20 g。动物由上海斯莱克实验动物有限公司提供,许可证号 SCXK(沪)2003-0003,于上海中医药大学实验动物中心清洁级饲养室饲养,实验期间自由饮水、摄食。

**1.2 药物及其制备** 吴茱萸购于上海养和堂张江分店,产地:江苏,批号 080927,经上海中医药大学中药学院李西宁教授鉴定系为芸香科植物吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth 的干燥近成熟果实。

制备方法:药材浸泡 1 h 后,水煎 2 次,每次先以武火煮沸,再以文火煮 30 min,过滤,合并滤液,减压浓缩至含生药 2.5 g·mL<sup>-1</sup>,置于 4 ℃ 冰箱保存备用,临用前用蒸馏水分别配成所需浓度的溶液。

**1.3 试剂和仪器** 丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂(R1;批号 B917, R2; B912); 天冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂(R1 批号 B917, R2 B912),均由上海世诺临床诊断制品株式会社提供。日立 7080 全自动生化分析仪(日本日立贸易有限公司);系统显微镜 BXS1/BX52(日本奥林巴斯光学株式会社)。

## 2 方法

**2.1 ig 给药的“时间-毒效”关系** 取小鼠 100 只,雌雄各半,随机分为 10 组,按处理时间点依次为 8,

15, 20, 25, 30 d 组,每个时间组又分为正常对照组和给药组。每天 ig 剂量为生药 50 g·kg<sup>-1</sup>,分 2 次给药,正常组同时间 ig 等容量蒸馏水 20 mL·kg<sup>-1</sup>,在各处理时间点前,小鼠禁食不禁水 12 h,于 ig 后 1 h 摘眼球取血,8 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,分离血清,用于检测血清 ALT, AST 水平,摘取小鼠肝脏,称重并计算肝脏指数。另取一部分肝组织,10% 福尔马林固定,HE 染色,光学显微镜 200 倍观察其组织形态学变化。对肝组织形态进行病理检测,并进行半定量分析:肝组织结构正常,无明显变性、坏死及炎症细胞浸润,记为 0 分;肝小叶结构尚正常,可见明显的混浊肿胀、气球样变或脂肪变性,散在点状坏死(+),记为 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(++),记为 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(+++),记为 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(++++) ,记为 4 分。

**2.2 ig 给药的“剂量-毒效”关系** 取小鼠 40 只,雌雄各半,随机分为正常对照、吴茱萸水煎液 3 个剂量组,ig 每天给药剂量分别为 100, 50, 25 g·kg<sup>-1</sup>,按 20 mL·kg<sup>-1</sup> ig 2 次/d;正常组 ig 等量蒸馏水。8 d 后,按方法 2.1 测定血清 ALT, AST 水平,计算脏器指数,另取一部分肝组织,同 2.1 法观察组织病理学变化。

**2.3 统计方法** 使用 SPSS 13.0 软件进行统计处理,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析法, Radit 法对肝组织病理积分的数据进行统计分析, *P* < 0.05 有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 ig 给药的“时间-毒效”关系**

**3.1.1 对血清 ALT, AST 水平的影响** 吴茱萸 50 g·kg<sup>-1</sup> 能显著性升高小鼠血清中的 ALT, AST 水平 (*P* < 0.01),且在给药后第 20 天,血清中的 ALT, AST 水平呈现高峰,ALT 水平是正常组血清的 ALT

水平的 20 倍,作用持续较长。肝脏指数在 8 d 即明显升高,与正常组相比,差异显著 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 吴茱萸  $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  连续 ig 不同时间对小鼠血清 ALT,AST 水平及肝脏指数的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	ALT /U·L <sup>-1</sup>	AST /U·L <sup>-1</sup>	肝/体比值/%
正常	10	31.7 ± 9.1	120.0 ± 31.8	4.66 ± 0.83
吴茱萸 8 d	9 <sup>3)</sup>	127.2 ± 42.0 <sup>2)</sup>	282.1 ± 69.8 <sup>2)</sup>	6.28 ± 0.98 <sup>2)</sup>
吴茱萸 15 d	10	110.6 ± 35.2 <sup>2)</sup>	222.3 ± 62.4 <sup>2)</sup>	6.98 ± 0.69 <sup>2)</sup>
吴茱萸 20 d	10	621.4 ± 244.9 <sup>2)</sup>	407.6 ± 132.8 <sup>2)</sup>	7.64 ± 0.76 <sup>2)</sup>
吴茱萸 25 d	10	209.3 ± 98.1 <sup>2)</sup>	139.5 ± 44.1 <sup>2)</sup>	7.83 ± 0.93 <sup>2)</sup>
吴茱萸 30 d	6 <sup>3)</sup>	359.8 ± 165.5 <sup>1)</sup>	417.3 ± 197.5 <sup>1)</sup>	7.25 ± 0.76 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;<sup>3)</sup> 8,30 d 组动物在处死前已有死亡(表 2~4 同)。

3.1.2 对肝组织病理学的影响 光镜下观察,给药组的肝脏主要表现为肝细胞肿胀,胞质疏松,核膨化,少部分可见小灶性或单细胞坏死,伴炎症细胞浸润。在给药第 25 d 和第 30 d,肝细胞均出现核膨化,可见明显的灶状坏死,伴有炎症细胞浸润,即随着时间的积累,肝脏损伤越来越严重,结果见图 1,表 2。

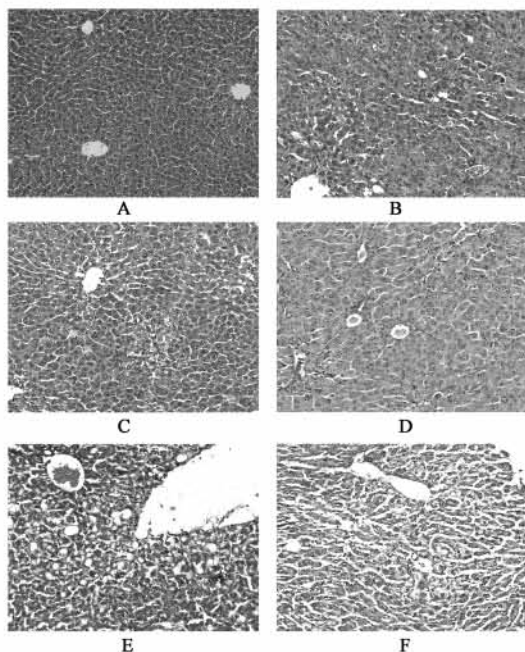


图 1 吴茱萸  $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  连续 ig 不同时间肝脏组织学改变 (HE 染色, ×200)

A. 正常组;B. 吴茱萸  $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  连续 ig 8 d 组;C. 吴茱萸  $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  ig 15 d 组;D. 吴茱萸  $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  ig 20 d 组;E. 吴茱萸  $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  连续 ig 25 d 组;F. 吴茱萸  $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  连续 ig 30 d 组。

表 2 吴茱萸  $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  连续 ig 不同时间对小鼠肝病理改变的影响

组别	n	病变程度					P
		-	+	++	+++	++++	
正常	10	10	0	0	0	0	-
吴茱萸 8 d	9 <sup>3)</sup>	5	3	1	0	0	>0.05
吴茱萸 15 d	10	2	6	2	0	0	>0.01
吴茱萸 20 d	10	2	5	3	0	0	>0.01
吴茱萸 25 d	10	0	2	8	0	0	>0.01
吴茱萸 30 d	6 <sup>3)</sup>	0	1	5	0	0	>0.01

### 3.2 ig 给药的“剂量-毒效”关系

3.2.1 对血清 ALT,AST 水平的影响 吴茱萸水煎液能升高小鼠血清中的 ALT,AST 和肝脏指数,其中中剂量和高剂量组与正常组相比,具非常显著性差异,且呈现剂量依赖性,见表 3。

表 3 不同剂量吴茱萸水煎液连续 ig 8 d 对小鼠血清 ALT,AST 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	n	ALT /U·L <sup>-1</sup>	AST /U·L <sup>-1</sup>	肝/体比值 /%
正常	-	10	31.7 ± 9.1	120.0 ± 31.8	4.66 ± 0.83
吴茱萸	25	10	50.4 ± 17.6	161.1 ± 30.7	5.32 ± 0.97
	50	9 <sup>△</sup>	127.2 ± 42.0 <sup>2)</sup>	282.1 ± 69.8 <sup>2)</sup>	6.28 ± 0.98 <sup>2)</sup>
	100	10	320.0 ± 131.3 <sup>2)</sup>	471.4 ± 143.7 <sup>2)</sup>	6.22 ± 0.74 <sup>2)</sup>

3.2.2 对肝组织病理学的影响 光镜下观察,高剂量组的小鼠肝脏均出现肝细胞肿胀,且有少部分可见小灶性或单细胞坏死,伴炎症细胞浸润,中剂量组的小鼠肝脏出现肝细胞肿胀,单细胞坏死,肝脏病变与剂量呈相关性,见表 4。

表 4 不同剂量吴茱萸水煎液连续 ig 8 d 对小鼠肝脏病理改变的影响

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	n	病变程度					P
			-	+	++	+++	++++	
正常	-	10	10	0	0	0	0	-
吴茱萸	25	10	9	1	0	0	0	<0.05
	50	9 <sup>3)</sup>	5	3	1	0	0	<0.05
	100	10	1	3	5	1	0	<0.01

## 4 讨论

中医药书籍中一般记载吴茱萸有小毒,但对其毒性成分、毒性表现均未见详细描述。实验证明吴茱萸水和 70% 乙醇提取物对小鼠未表现出急性毒

性,亦无遗传毒性<sup>[3]</sup>。而临床报道提示大剂量吴茱萸对中枢有兴奋作用,并可引起视力障碍及错觉。本课题组前期实验发现吴茱萸水煎液对肝功能有一定影响,这方面的报道却非常少,本研究意在探讨大剂量吴茱萸是否具有潜在的肝毒性。

实验研究表明,小鼠 ig  $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  吴茱萸水煎液后,均有便溏现象出现,小鼠在连续 ig 大剂量的吴茱萸( $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )后,其 ALT, AST, 肝脏指数均明显升高,其中 ALT 和 AST 均在 20 d 时达到高峰,肝脏指数在第 25 d 达到最高峰。肝组织病理形态学显示,吴茱萸组的肝脏主要表现为肝细胞肿胀,在给药后期,均出现肝细胞空泡变性,核膨化,可见明显的灶状坏死,伴有炎症细胞浸润,病理学改变可看出随着时间延长,毒性由功能性改变进一步发展为组织病理学损伤。小鼠肝毒性的量效关系时显示,连续给予吴茱萸后,小鼠的 ALT, AST, 肝脏指数均有显著性的升高,且存在剂量依赖性,大于  $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  肝组织病理形态学显示,中、高剂量组均出现肝细胞肿

胀,甚至可见小灶性或单细胞坏死,这表明,当吴茱萸的用量达到一定剂量后,ALT, AST 水平,肝脏指数和病理形态学的改变均呈明显的肝毒性量效关系。

由于吴茱萸在临床上多以水煎为主,所以本实验采用吴茱萸的水煎液为研究对象,进行吴茱萸的肝毒性初步研究,为临床的安全用药提供实验依据,尤其是对肝功能不良的患者应予以注意。

#### [参考文献]

- [1] 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,2006,25(3):171.
- [2] 陈云云,袁玉芬. 浅谈吴茱萸的中毒与治疗[J]. 浙江中西医结合杂志,1999,9(4):58.
- [3] 杨秀伟. 吴茱萸水和 70% 乙醇提取物的急性毒性和遗传毒性试验[J]. 中国中药杂志,2008,33(11):1317.

[责任编辑 聂淑琴]