

山豆根对小鼠急性肝毒性及其病理形态学研究

盛云华, 李峰杰, 周绮, 金若敏*

(上海中医药大学药物安全评价研究中心, 上海 201203)

[摘要] 目的: 研究山豆根致小鼠急性肝毒性的时效量效关系及病理形态学变化。方法: 小鼠口服山豆根水煎液, 常规观察 14 d, 测定其 LD_{50} 。另取小鼠按不同时间点、不同剂量分组, 计算肝脏指数及光镜下观察肝组织病理学变化。结果: 采用 Bliss 法测得 2 个批号山豆根的 LD_{50} 为 A(批号 081012) $31.935 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 95% 可信限为 $30.509 \sim 33.506 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; B(批号 0904295) LD_{50} 为 $16.39 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 95% 可信限为 $14.426 \sim 18.38 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。肝毒性时效关系显示: 与正常组相比, 口服山豆根水煎液 A $30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, B $12.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 给药 6 h 后肝脏均明显肿大, 肝指数显著升高 ($P < 0.01$), 肝组织损伤在 24 h 最严重。量效关系显示: 与正常组相比, 口服山豆根水煎液 A $16.4, 10, 3.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, B $12.4, 10.8, 10, 9.2, 8, 7.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 肝脏指数显著性升高 ($P < 0.01$); 随剂量的增大, 肝组织病理损伤程度均增加。结论: 小鼠一次性口服大剂量山豆根水煎液可造成急性肝损伤, 并显示一定的毒性时-效、量-效关系。

[关键词] 山豆根; 肝毒性; 病理

[中图分类号] R 285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)06-0144-04

Study on the Hepatotoxicity and Pathological Change Induced by Radix et Rhizoma Sophorae Tonkinensis in Mice

SHENG Yun-hua, LI Feng-jie, ZHOU Qi, JIN Ruo-min*

(Research Center of Animal Safety Evaluation, Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To study the dose and time dependent hepatotoxicity and pathological change induced by Radix et Rhizoma Sophorae Tonkinensis (RRST) in mice. **Method:** After 14 days observation, the medial lethal dose (LD_{50}) of RRST decoction with oral administration in mice was calculated. In addition, the liver weight/body weight index was measured, and pathological change of liver under microscope was observed. **Result:** The LD_{50} value of RRST of batch A (No. 081012) was $31.935 \text{ g (crude drug) /kg}$, with the 95% confidence level between $30.509 \sim 33.506 \text{ g (crude drug) } \cdot \text{kg}^{-1}$; that of batch B (No. 0904295) was $16.39 \text{ g (crude drug) } \cdot \text{kg}^{-1}$, with the 95% confidence level between $14.426 \sim 18.38 \text{ g (crude drug) } \cdot \text{kg}^{-1}$. The time dependent study indicated that the enlargement of the liver and the liver weight/body weight indexes of the mice 6 hour after oral administration with decoction A at the dosage of $30 \text{ g (crude drug) } \cdot \text{kg}^{-1}$, or decoction B at the dosage of $12.4 \text{ g (crude drug) } \cdot \text{kg}^{-1}$, were obviously increased when compared with that of the normal control mice. The hepatic damage was most serious in 24 hours. The dose dependent study indicated that oral administration with decoction A at the dosage of 16.4, 10, 3.2, and decoction B at the dosage of 12.4, 10.8, 10, 9.2, 8, 7.2 g (crude drug) / kg caused increase of liver weight/body weight indexes, and dose dependent damage of the liver tissue. **Conclusion:** One-time oral administration with large dose of decoction of RRST may induce acute hepatotoxicity and even death in mice in a time and dose dependent manner.

[Key words] Radix et Rhizoma Sophorae Tonkinensis; hepatotoxicity; pathology

[收稿日期] 20100204(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] 盛云华, 在读博士, 研究方向: 中药新药及毒理, Tel: (021) 51323053, E-mail: yhsheng08@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 金若敏, 本科, 研究员, 博士生导师, 从事中药新药及毒理研究, Tel: (021) 51322401, E-mail: rmj801@126.com

山豆根为豆科植物越南槐 *Sophora tonkinensis* Cagnep. 干燥根及根茎, 性味苦寒, 有毒, 有清热解毒、利咽消肿之功效^[1]。山豆根为治咽要药, 临床应用非常广泛, 用于火毒蕴结, 咽喉肿痛等^[2]。近年来关于服用山豆根导致神经毒性和胃肠道反应的临床报道较多见^[3-7], 但实验研究报道不多, 本文就小鼠单次灌服山豆根后肝毒性的时效与量效关系进行了初步研究。

1 材料与仪器

1.1 动物 KM 小鼠, 雌雄各半, 体重 (20 ± 2) g, 合格证号 scxk(沪) 2007-2005, 由中国科学院上海动物中心提供, 动物均在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, 室内温度控制在 22 ~ 24 °C, 通风及湿度良好。

1.2 药物 山豆根药材, 产地四川, 批号 081012, 购于上海养和堂张江分店(以下简称山豆根 A); 产地四川, 批号 0904295, 购于四川新荷花中药饮片有限公司(以下简称山豆根 B), 均经上海中医药大学李西林副教授鉴定系为豆科植物越南槐 (*Sophora tonkinensis* Cagnep.) 的干燥根及根茎。山豆根药液的制备: 称取一定量山豆根药材 A 或 B, 加 5 倍量水浸泡 1 h, 先武火煮沸, 再文火煮 0.5 h, 趁热过滤, 药液减压浓缩至一定体积。

1.3 仪器 电子天平 AR 2130(奥豪斯国际贸易上海有限公司); 2 ~ 16 K 冷冻离心机 (Sigma 公司) 旋转蒸发仪 (BUCHI), SHB-III 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); 全能型脱水机 (徠卡公司)。

2 方法

2.1 半数致死量 (LD₅₀) 取小鼠, 雌雄各半, 随机分组, 每组 10 只, 经预试按照等比级数 A(1:0.85)、B(1:0.6) 分别确定 4, 5 个剂量组。各给药组按 0.4 mL/10 g, ig 1 次, 正常组同时 ig 等容量蒸馏水。连续观察 14 d。观察并记录给药后的一般状况和死亡情况; 死亡小鼠解剖后肉眼观察各脏器有无异常变化。

2.2 “毒性时-效”关系 取小鼠, 雌雄各半, 随机分组, 按处理时间点为 A:0(即正常组), 1, 2, 6, 12, 24, 48, 72 h 组, B:0(即正常组), 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 h 组。0 h 组小鼠 ig 蒸馏水, 药物组 ig 山豆根 A 30 g 生药/kg、B 12.4 g 生药/kg, 按 0.4 mL/10 g ig 1 次, 于相应时间点称量小鼠体重, 摘取小鼠肝脏, 称

重并计算肝脏指数。另取一部分肝组织, 常规 HE 染色, 光学显微镜下观察其组织形态学变化。参照文献[8]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, 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。

2.3 “毒性量-效”关系 取小鼠, 雌雄各半, 随机分组, 山豆根 A: 正常组和药物组 3 个剂量组, 分别为 16.4, 10, 3.2 g 生药/kg; 山豆根 B: 正常组和药物组 6 个剂量组, 12.4, 10.8, 10, 9.2, 8.0, 7.2 g · kg⁻¹, 正常组 ig 蒸馏水, 按 0.4 mL/10 g ig 1 次。24 h 后, 按方法 2.2 计算脏器指数, 另取一部分肝组织, 用于观察组织形态学变化。

2.4 统计学方法 采用 Bliss 软件计算 LD₅₀, Radit 法对肝组织病理积分的数据进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 16.0 软件进行统计处理, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差法, 组间两两比较方差齐性时用 LSD 方法分析, 方差不齐时用 Dunnett's 方法分析。

3 结果

3.1 半数致死量 LD₅₀测定 灌胃 A 后 1 ~ 2 h 多数动物出现双目闭合, 竖毛, 活动减少, 呼吸急促, 震颤, 阵发性痉挛, 抽搐。死亡动物解剖时肉眼可见少部分动物肝脏有散在的瘀血点。根据死亡率计算 LD₅₀ 为 31.935 g · kg⁻¹, 95% 可信限为 30.509 ~ 33.506 g · kg⁻¹; 灌胃 B 后部分动物在灌胃给药 0.5 ~ 1 h 出现双目闭合, 竖毛, 活动减少, 呼吸急促, 震颤, 阵发性痉挛, 抽搐。继而, 出现异常反应的小鼠部分死亡, 死亡时间集中在 5 h 内。死亡小鼠解剖时肉眼可见少部分动物肝脏有散在的瘀血点, 胃肠道内容物充盈, 肠壁充血, 其他脏器未见异常。给药 12 h 后部分有异常反应的小鼠可恢复正常。根据动物死亡率计算 LD₅₀ 为 16.39 g · kg⁻¹, 95% 的可信限为 14.426 ~ 18.38 g · kg⁻¹。

3.2 “毒性时-效”关系

3.2.1 对肝脏指数的影响 给药 6 h 后即可出现肝脏明显肿大, 肝指数升高 (*P* < 0.01), 结果见表 1。

表 1 灌服山豆根不同时间对小鼠肝脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, g/g \times 100$)

组别	A(30 g · kg ⁻¹)		B(12.4 g · kg ⁻¹)	
	n	肝脏指数	n	肝脏指数
0 h	10	4.63 ± 0.32	12	4.33 ± 0.25
1 h	10	4.67 ± 0.32	12	4.84 ± 0.30 ²⁾
2 h(3 h)	9	4.80 ± 0.32	11	4.80 ± 0.37 ²⁾
6 h	10	5.48 ± 0.26 ²⁾	10	5.51 ± 0.22 ²⁾
12 h	9	5.92 ± 0.52 ²⁾	11	6.88 ± 0.60 ²⁾
24 h	11	7.50 ± 0.50 ²⁾	11	6.39 ± 0.34 ²⁾
48 h	11	6.25 ± 0.35 ²⁾	10	6.22 ± 0.55 ²⁾
72 h	10	5.82 ± 0.31 ²⁾	10	6.16 ± 0.37 ²⁾

注:与 0 h 比较,¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01, 动物数为存活动物。

3.2.2 对肝组织形态的影响 光镜下,正常组肝小叶结果清晰完好,肝细胞未见明显变形,坏死,肝窦未见明显瘀血扩张;给药 A 1 h 出现肝小叶周围性胞质疏松;2 h 出现多个单细胞坏死及空泡变性;6 h 肝细胞核固缩,细胞肿大呈气球样变;12 h 肝脏肿大,广泛空泡变性;24 h 呈气球样变性;48 h 出现细胞胞质疏松,72 h 呈现胞质疏松,损伤减轻。给药 B 1 h,肝小叶周围性胞质疏松;给药后 3 h,可见多个单细胞坏死,空泡变性,小灶性坏死伴炎症细胞反应;给药后 6 h,可见肝细胞核固缩,细胞肿大呈气球样变;给药 12 h,肝细胞广泛空泡变性;给药后 24 h,肝细胞肿大,广泛空泡变性,气球样变性;给药后 48 h,肝细胞上灶性坏死并伴炎症细胞反应;给药后 72 h,细胞胞质疏松。积分统计结果见表 2~3。

表 2 山豆根 A 对小鼠时效肝损伤病理 Radit 分析

组别	病变程度					合计	P
	-	+	++	+++	++++		
0 h	10	0	0	0	0	10	
1 h	7	3	0	0	0	10	>0.05
2 h	2	5	2	0	0	9	<0.05
6 h	4	3	3	0	0	10	<0.05
12 h	0	5	4	0	0	9	<0.05
24 h	0	6	5	0	0	11	<0.05
48 h	4	7	0	0	0	11	<0.05
72 h	8	2	0	0	0	10	>0.05

表 3 山豆根 B 对小鼠时效肝损伤病理 Radit 分析结果

组别	病变程度					合计	P
	-	+	++	+++	++++		
0 h	12	0	0	0	0	12	
1 h	13	0	0	0	0	13	>0.05
3 h	11	0	0	0	0	11	<0.05
6 h	4	6	0	0	0	10	<0.05
12 h	0	9	2	0	0	11	<0.05
24 h	0	0	9	0	0	9	<0.05
48 h	0	0	8	2	0	10	<0.05
72 h	1	7	2	0	0	10	>0.05

3.3 小鼠口服“毒性强效”关系

3.3.1 肝脏指数的影响 山豆根 A 及山豆根 B 各剂量组肝脏指数均显著性升高,与正常组比较有极显著性差异 (P < 0.01), 结果见表 4~5。

表 4 山豆根 A 不同剂量对小鼠肝脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	肝脏指数(g · g ⁻¹ × 100)
空白	—	4.12 ± 0.28
山豆根 A	16.4	5.18 ± 0.35 ²⁾
	10	4.8 ± 0.39 ²⁾
	3.2	4.54 ± 0.28 ²⁾

注:与 0 h 比较,¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01, 下表同。

表 5 山豆根 B 不同剂量对小鼠肝脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	n	肝脏指数(g/g × 100)
正常组	—	14	5.82 ± 0.42
山豆根 B	12.4	11	6.39 ± 0.34 ²⁾
	10.8	11	6.61 ± 0.60 ²⁾
	10	13	6.41 ± 0.49 ²⁾
	9.2	14	6.60 ± 0.38 ²⁾
	8	14	6.70 ± 0.57 ²⁾
	7.2	13	6.75 ± 0.66 ²⁾

3.3.2 对肝组织形态的影响 山豆根 A 光镜下,正常组肝小叶结果清晰完好,肝细胞未见明显变形,坏死,肝窦未见明显瘀血扩张;16.4 g 生药/kg 剂量组出现肝细胞肿大,水样变性;10 g 生药/kg 剂量组出现单细胞坏死,细胞胞质疏松;3.2 g 生药/kg 剂量组出现肝细胞胞质疏松;山豆根 B 在光镜下观察,正常组部分动物肝小叶结构清晰完好,肝细胞未见明显变性、坏死,肝窦未见明显瘀血扩张;部分动物有肝细胞肿大,空泡变性;12.4 g/kg 剂量组,细胞肿大,细胞变性;10.8 g/kg 剂量组,细胞肿大,细胞变性;10.0 g/kg 剂量组,细胞气球样变;9.2 g/kg 剂量组,细胞肿大,细胞变性;8 g/kg 剂量组,肝细胞肿大,空泡变性;7.2 g/kg 剂量组,肝细胞肿大,空泡变性。积分统计结果见表 6~7。

表 6 山豆根 A 不同剂量对小鼠肝脏损伤病理 Radit 分析结果

组别	病变程度					合计	P
	g/kg	-	+	++	+++		
空白组	12	0	0	0	0	12	
16.4	6	6	0	0	0	12	<0.05
10	8	4	0	0	0	12	<0.05
3.2	11	1	0	0	0	12	>0.05

(下转第 151 页)

②备青藤碱的稳定性同位素,根据其分子离子峰的细微差异作为分离依据,以其稳定性同位素做为内标物,采用 LC-MS 检测以提高相对损失率的精确度和稳定性。

[参考文献]

[1] Yun-Ju Chen, Lie-Chwen Lin, Ming-Hwang Shyr, *et al.* Pharmacokinetics of protein-unbound linezolid in the blood and the mechanism of hepatobiliary excretion in the rat [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 570:59.

[2] Horst Beier, Katharina Kaiser, Manfred Langhans, *et al.* Peritoneal microdialysis in freely moving rodents: An alternative to blood sampling for pharmacokinetic studies in the rat and the mouse [J]. *Eur J Pharma Sci*, 2007, 30(1):75.

[3] Elisabet Børsheim, Per-Anders Jansson. Experiences of the 14C-ethanol technique for blood flow measurements in human subcutaneous adipose tissue [J]. *Life Sci*,

1998, 62(11):967.

[4] L. Zimmer, E. Kodas, D. Guilloteau, *et al.* Microdialysis as a tool for in vivo study of dopamine transporter function in rat brains [J]. *J Neurosci Methods*, 2000, 103(2):137.

[5] Magnus Rizell, Peter Naredi, Per Lindnér, *et al.* Histamine pharmacokinetics in tumor and host tissues after bolus-dose administration in the rat [J]. *Life Sci*, 2002, 70(8):969.

[6] Kay D Rittenhouse, Robert L Peiffer Jr, Gary M Pollack. Evaluation of microdialysis sampling of aqueous humor for in vivo models of ocular absorption and disposition [J]. *J Pharm Biomed Analysis*, 1998, 16(6):951.

[7] Magnus Rizell, Peter Naredi, Per Lindnér, *et al.* Validation of the internal reference technique for microdialysis measurements of interstitial histamine in the rat [J]. *Life Sci*, 1999, 65(17):1765.

[责任编辑 邹晓翠]

(上接第 146 页)

表 7 山豆根 B 不同剂量对小鼠肝脏损伤病理 Radit 分析结果

组别 g/kg	病变程度					合计	P
	-	+	++	+++	####		
空白	3	2	4	2	0	11	
12.4	0	3	3	0	0	6	>0.05
10.8	0	1	5	8	0	14	>0.05
10	0	3	6	4	1	14	<0.05
9.2	0	6	4	4	0	14	<0.05
8	0	4	7	1	0	12	<0.05
7.2	0	3	6	5	0	14	<0.05

4 讨论

山豆根为临床常用药,临床不良反应报道中以胃肠道反应为主,但神经毒性反应引起的损害最严重,两者经常伴行。为了临床更加安全应用山豆根,对其毒性进行研究,了解其毒性特点是非常必要的。山豆根急性毒性时量效关系病理形态学研究显示:给药后肝细胞肿大,肝脏指数均显著升高,病理检查均显示肝细胞不同程度的损伤,主要表现为肝细胞肿大,变性坏死,炎症细胞的浸润。本实验结果显示山豆根单次大剂量给药可加重肝脏负荷,造成肝脏病理损伤,并呈现一定的时量效关系,临床运用山豆根时应把握好剂量,防止剂量过大造成肝损伤。

另外,本实验中的山豆根虽同为四川产地,提取

方法与保存方法一样,但药材供应商不同,批号也不同,毒性剂量显示有较大的差异,可能为药材种植环境不同,导致毒性成分含量有一定差别,毒性特征不一样,有可能其疗效也存在一定的差异。因此应进一步加强对其质量控制研究,保证临床更加安全有效的应用山豆根。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会·中国药典[S].一部.北京:化学工业出版社,2005:19.

[2] 葛红强. 山豆根临床应用与研究[J]. *时珍国医国药*, 2000, 11(11):1036.

[3] 武忠秀. 儿童服用山豆根中毒 1 例报道[J]. *中国民间疗法*, 2004, 12(10):58.

[4] 林雪. 服过量山豆根煎剂致严重不良反应 1 例[J]. *中国中药杂志*, 2002, 27(7):559.

[5] 王兴远, 张维明. 群体性急性山豆根中毒的救治体会(附 56 例报告)[J]. *华西医学*, 2009, 24(8):2036.

[6] 公素琴, 朱孟国. 山豆根毒副反应综述[J]. *云南中医中药杂志*, 2004, 25(2):48.

[7] 连梅耘. 中药山豆根的不良不良反应[J]. *海峡药学*, 2008, 20(8):173.

[8] 何桂霞, 李玲, 肖锦仁, 等. 藤茶总黄酮对四氯化碳致急性肝损伤小鼠的保护作用[J]. *湖南中医学院学报*, 2004, 24(4):7.

[责任编辑 邹晓翠]