

甘草地上部分的安全性评价

赵梓邯¹, 张琳¹, 杨柳¹, 崔洁², 侯俊玲^{1,3*}, 王文全^{2,3*}, 李大雁¹

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102;

2. 中国医学科学院, 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193;

3. 中药材规范化生产教育部工程研究中心, 北京 100102)

[摘要] **目的:**评价甘草地上部分的毒理学安全性,为合理利用甘草地上部分资源提供依据。**方法:**采用急性经口毒性实验、小鼠骨髓细胞微核实验、小鼠精子畸形实验以及基于炎症模型的安全性实验的方法,并对实验结果进行统计分析判定。**结果:**甘草地上部分水提物和醇提物对小鼠的最大耐受剂量(MTD)分别为96,128 g·kg⁻¹,醇提物大孔树脂富集产物对小鼠有伤害且表现出性别差异。骨髓细胞微核实验甘草地上部分水提物低、中、高剂量(8,16,32 g·kg⁻¹)组和正常组的微核率分别为0.28%,0.34%,0.26%,0.22%(雌性)和0.32%,0.30%,0.36%,0.28%(雄性);小鼠精子畸形实验甘草地上部分低、中、高剂量(8,16,32 g·kg⁻¹)组和正常组的精子畸形率分别为3.16%,3.01%,2.67%,3.23%;微核率和精子畸形率与正常组比较无明显增加;30 d重复灌胃水提物和醇提物对模型大鼠的一般情况无影响,其中,与正常组比较,甘草地上部分醇提组心脏质量显著降低($P < 0.05$),肝脏质量、肝脏指数和肾脏指数明显升高($P < 0.05$);水提组与醇提组的球蛋白与血肌酐明显升高($P < 0.05$),个别大鼠氨基转移酶异常;解剖学考察发现4例肉眼可见的肝病变,其中甘草地上部分水提组3例,甘草地上部分醇提组1例,组织病理学检查发现肝细胞变性与组织炎症,与出现生化指标与脏器指数异常的大鼠一致。**结论:**甘草地上部分水提物、醇提物具有潜在毒性,水提物未显示对小鼠有遗传毒性,其安全性尚需进一步研究。

[关键词] 甘草地上部分; 安全性评价; 急性毒性; 遗传毒性; 肝肾毒性

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)03-0074-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190218

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181031.0726.010.html>

[网络出版时间] 2018-11-02 11:24

Safety Evaluation of Over-ground Parts of *Glycyrrhiza uralensis*

ZHAO Zi-han¹, ZHANG Lin¹, YANG Liu¹, CUI Jie², HOU Jun-ling^{1,3*}, WANG Wen-quan^{2,3*}, LI Da-yan¹

(1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China; 3. Engineering Research Center of Good Agricultural

Practice for Chinese Crude Drugs, Ministry of Education, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the toxicological safety of over-ground parts of *Glycyrrhiza uralensis*, in order to provide basis for the rational utilization of over-ground parts of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* recourses. **Method:** Mice acute oral toxicity test, micronucleus test of mice bone marrow, mice sperm shape abnormality test and toxicological test based on chronic nonbacterial prostatitis model were carried out. **Result:** Maximal tolerable dose (MTD) of over-ground parts of *G. uralensis* water extract (WE) and alcohol extract (AE) were 96, 128 g·kg⁻¹, respectively. Macro-porous resin enriched product of AE was harmful to mice, with gender

[收稿日期] 20180620(014)

[基金项目] 科技部国家重点研发计划项目(2017YFC1701403)

[第一作者] 赵梓邯,在读硕士,从事中药资源的开发和利用研究,E-mail:xingluo66@sina.cn

[通信作者] *侯俊玲,教授,硕士生导师,从事中药资源的开发和利用研究,Tel: 010-84738334,E-mail:mshjl@126.com;

*王文全,教授,博士生导师,从事中药材规范化生产及其调控机制研究,E-mail:wwq57@126.com

differences. Micronucleus rates of each dose (8, 16, 32 g · kg⁻¹) group and control group for female mouse were 0.28%, 0.34%, 0.26% and 0.22%, respectively. Micronucleus rates of each dose (8, 16, 32 g · kg⁻¹) group and control group for male mouse were 0.32%, 0.30%, 0.36% and 0.28%, respectively. Sperm shape abnormality rates of each dose group and control group were 3.16%, 3.01%, 2.67% and 3.23%, respectively. Micronucleus rate and sperm shape abnormality rate had no significant increase compared with the negative control. The 30-day repeated intragastric WE and AE had no effect on the general conditions of the model rats. Compared with normal group, AE group showed a significant decrease in heart weight, and significant increases in liver weight, liver index and kidney index ($P < 0.05$). Both of AE and WE group showed significant increases in globulin (GLB) and creatinine (CRE) levels ($P < 0.05$). The transaminases of individual rats were abnormal. Four liver pathological changes were found in necropsy, histopathological examination revealed that liver cells degeneration, necrosis and liver tissue inflammation occurred in the individual rats with abnormalities in biochemical index and organ index. **Conclusion:** The results indicated that both of WE and AE have potential toxicity. WE does not show any genetic toxicity to mice. Therefore, further studies shall be made for toxicological safety of over-ground parts of *G. uralensis*.

[**Key words**] over-ground parts of *Glycyrrhiza uralensis*; safety evaluation; acute toxicity; genetic toxicity; liver and kidney toxicity

甘草属作为药用植物在世界范围的使用已有至少 2 000 年历史^[1],甘草是常用药材,“经方少有不用者”。甘草传统入药部位是根及根茎,值得注意的是,其地上部分资源同样丰富,且适当割取地上部分有利于根及根茎活性物质的积累,与此同时,甘草地上部分还具有独特的药理活性^[2]。目前仅部分作为牧草,资源利用率极低。迄今为止,已从甘草属地上部分分离得到 61 个黄酮类化合物和 7 个其他酚类成分^[3]。基于本课题组前期研究发现,甘草地地上和地上部分的黄酮类成分 HPLC 指纹图谱差异很大,且地上部分含量显著高于地下部分,其中以叶中黄酮类化合物含量最高^[4];甘草地上部分黄酮类成分具有良好的自由基清除及还原能力^[5],尤其对大鼠雌激素诱导型和自体免疫型慢性非细菌性前列腺炎(CNP)的有较显著的预防和治疗作用^[6]。

甘草地上部分作为非传统药用部位,体现出新资源开发价值的同时,对其的安全性研究亦必不可少,然国内尚无相关的系统实验研究。在此背景下,本研究首次以甘草地上部分多种提取物为受试物,运用急性经口毒性实验、小鼠精子畸形实验、红细胞微核实验以及基于炎症模型的安全性评价实验的方法,并创新地对不同提取物及其富集产物进行对比分析,初步得到甘草地上部分的口服安全性信息,为其资源的综合开发利用与后续深入毒理学研究提供实验依据。

1 材料

1.1 药物与试剂 甘草地上部分是采自甘肃省酒

泉市瓜州县河东乡的栽培甘草,以叶为主约占 80%。经王文全教授鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的地上部分,传统用药部位为根及根茎,本实验采用植株的地上部分。水提物的制备^[7],甘草地上部分打粉,料液比 1:10,去离子水煎煮 1.5 h,煎煮 2 次,趁热过滤,浓缩滤液,65 °C 烘干,收集浸膏,4 °C 下保存备用,浸膏粉 1 g 相当于原药材 6.4 g。醇提物的制备,依据课题组前期研究得到的最佳醇提工艺稍作调整^[8],以 70% 乙醇,料液比 1:10,70 °C 下超声提取 20 min,前后 2 次,浸膏粉 1 g 相当于原药材 7.8 g;醇浸膏过大孔树脂柱富集,得到 A、B 两个分段。浸膏粉混悬于 0.7% 的羧甲基纤维素钠(CMC-Na)水溶液中,配置成不同受试物浓度,用于大鼠灌胃,下文所涉剂量均为生药量,便于毒性大小的比较。以黄酮为主体指标成分,各受试物的总黄酮含量依次为水提物 19.6%,醇提物 16.7%,A 富集分段 44.3%,B 富集分段 38.1%。环磷酸胺(Coolaber 公司,批号 CC28111860);小牛血清(浙江天航生物科技股份有限公司,批号 20170106);Giemsa 染液(Sigma 公司,批号 20180104124);苏木素-伊红染液,角叉菜胶(Solarbio 公司,批号分别为 20171115,20170522);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 07/2018)。

1.2 仪器 CX4 Pro 型全自动血生化分析仪(美国贝克曼公司),Multiskan FC 型酶标仪(中国赛默飞

有限公司),CX23LEDRFSIC 型显微镜(日本奥林巴斯公司)。

1.3 动物 SPF 级昆明种小鼠,体质量 18~22 g, 25~30 g, 25~35 kg, 购自北京市维通利华实验动物技术有限公司(用于急性经口毒性实验、小鼠骨髓细胞微核实验、小鼠精子畸形实验),合格证号 SCXK(京)2016-0006。SPF 级 SD 雄性大鼠 32 只,体质量 180~220 g, 购自北京斯贝福实验动物技术有限公司(用于大鼠抗炎安全性实验),合格证号 SCXK(京)2016-0002。实验动物常规饲养,保持恒温 24℃, 12 h 光/暗周期下,接受标准的饮食和水,自由采食。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批准,符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。

2 方法

2.1 小鼠急性经口毒性实验 选取 SPF 级昆明种小鼠,雌雄各半,体质量 18~22 g, 每组雌雄各 10 只。为达到能给予的最大给药量,水提物剂量先设计为 128 g·kg⁻¹, 后调整为 96 g·kg⁻¹, 醇提物设置剂量 128 g·kg⁻¹, 本受试物尚无相关毒理研究,该剂量为本实验摸索得到;大孔树脂 A, B 富集分段水溶性差,给予可达到的最大剂量,对应浸膏量(生药量)分别为 3.5(266), 5.5(537) g·kg⁻¹。24 h 内 2 次经口灌胃给予受试物,间隔 5 h, 体积合计达到 80 mL·kg⁻¹。第 1 次给药前 16 h 动物禁食不禁水,每次灌胃后 4 h 内仔细观察小鼠中毒及死亡情况,其后每日观察 1 次,记录死亡情况,濒死者处死确定死亡时间。于第 1, 4, 7, 14 天称取体质量,第 14 天处死所有存活小鼠。对实验期间死亡、人道处死及结束期处死的小鼠进行大体解剖,记录肉眼可见脏器病变。

2.2 小鼠精子畸形检测 选取 SPF 级昆明种小鼠,雄性, 25 只, 体质量 25~35 g, 随机分成 5 组。设置甘草地上部分水提物高、中、低剂量组(32, 16, 8 g·kg⁻¹)^[9], 环磷酰胺组(40 mg·kg⁻¹) 和正常组。给药组灌胃给予水提物羧甲基纤维素钠(CMC-Na)混悬水溶液, 正常组灌胃给予等体积 CMC-Na 水溶液, 环磷酰胺组灌胃给予等体积环磷酰胺 CMC-Na 水溶液, 给药体积 20 mL·kg⁻¹, 每日 1 次, 连续 5 d。首次给药后的第 35 天颈椎脱臼处死小鼠, 取出两侧附睾, 置入预先加有 2 mL 生理盐水的培养皿, 将附睾纵向剪 1~2 刀, 静置 5 min, 滤过后吸滤液涂片。空气干燥后, 用甲醇固定, 1% 伊红染色, 蒸馏水洗净后晾干。每只动物计数 1 000 个结构完整的精子, 计算畸形精子类型及精子畸形率^[10]。

2.3 小鼠骨髓细胞微核检测 选 SPF 级昆明种小鼠 50 只, 雌雄各 25 只, 体质量 25~30 g, 随机分成 5 组, 每组雌雄各 5 只。分组、剂量设计及小鼠给药体积同 2.2 项。两次给予受试物间隔 24 h, 第 2 次给药后 6 h 颈椎脱臼处死小鼠, 取胸骨骨髓涂片, 干燥, 甲醇固定 10 min 后 Giemsa 染色, 用磷酸缓冲液冲洗、晾干。显微镜下每只动物观察 1 000 个嗜多染红细胞(PCE), 计数含有微核的 PCE 数; 每只动物计数 200 个红细胞, 并同时计数成熟红细胞(NCE), 计算 PCE/(PCE+NCE)^[10]。

2.4 基于炎症模型的安全性评价

2.4.1 大鼠分组及炎症模型的建立 基于抗前列腺炎实验, 选取 SPF 级 SD 雄性大鼠 32 只, 体质量 180~220 g, 随机分成 4 组, 每组 8 只。设置正常组(假手术组), 模型组, 水提组(6.4 g·kg⁻¹), 醇提组(7.8 g·kg⁻¹)。大鼠适应喂养 4 d, 乙醚麻醉, 沿大鼠下腹部正中切口开腹, 模型组与治疗组大鼠向前列腺腹侧和背侧叶内分别注入 1% 无菌角叉菜胶生理盐水溶液 0.1 mL, 正常组(假手术组)注射生理盐水, 然后缝合腹壁。1 周后取血清以 ELISA 试剂盒检测 TNF-α 水平, 各组较正常组均显著升高, 且观察到前列腺肿胀变大, 确认模型建立成功。空白组灌胃给予 0.7% 的 CMC-Na 水溶液, 其余组灌胃给予受试物, 连续 30 d, 灌胃体积为 20 mL·kg⁻¹。

2.4.2 大鼠一般情况记录与大体解剖 记录大鼠一般情况, 如有死亡则对其解剖尸检并记录病变情况, 每周记录 1 次体质量, 实验末期称重后, 动物禁食不禁水过夜, 次日称空腹体质量后所有实验大鼠经尸检大体解剖, 摘取心、肝、脾、肺、肾、胸腺、肾上腺、睾丸、附睾称质量, 计算脏器指数。

2.4.3 血生化检测与组织病理学检查 实验末期称质量后, 动物禁食不禁水过夜, 次日称空腹体质量后, 腹主动脉取血, 15 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 取血清, 采用全自动血生化分析仪检测血生化指标。所有实验大鼠经尸检, 大体解剖摘取心、肝、脾、肺、肾、胸腺、肾上腺、睾丸、附睾称重, 计算脏器指数; 尸检中肉眼发现病变的脏器取样, 10% 中性甲醛固定 48 h 后, 将组织修块, 脱水后石蜡包埋, 切片, 常规苏木-伊红染色(HE), 中性树胶封片, 显微镜下观察组织病理变化, 进行组织病理学检查。

2.5 统计学处理 采用 SAS 8.2 统计软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 甘草地上部分对小鼠的急性经口毒性影响

甘草地上部分水提物 $128 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组雌性小鼠出现 40% 死亡, 雄性小鼠出现 20% 死亡, 正常组给予相同体积溶剂无一死亡, 说明此剂量不是安全剂量, 后续实验调整为 $96 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 甘草地上部分醇提物设置 $128 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 采用最大耐受剂量法, 14 d 观察期内, 所有动物中枢神经系统及躯体运动、自主神经系统、呼吸系统、循环系统、毛色、行为、分泌物、排泄物正常, 未见明显中毒症状, 无动物死亡, 小鼠体质量正常增长, 表明甘草地上部分水提物对小鼠经口给药的最大耐受量可能为 $96 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 醇提物对小鼠经口给药的最大耐受量可能为 $128 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 醇提物显示出更高的安全性。醇提物大孔树脂 A 富集分段组雌性小鼠出现 20% 死亡, 雄性小鼠出现 83% 死亡; B 富集分段组雌性小鼠出现 20% 死亡, 雄性小鼠出现 67% 死亡, 死亡率与性别相关, 雄性小鼠死亡率高于雌性。见表 1。

表 2 甘草地上部分水提物对小鼠精子形态的影响 ($n=5$)

Table 2 Effect of *Glycyrrhiza uralensis* water extract (WE) on sperm morphology of mice ($n=5$)

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	畸形精子/个					总数	精子畸形率 ($\bar{x} \pm s$)/%
		无钩	香蕉型	胖头	无定型	其他 ¹⁾		
正常	-	47	25	16	71	6	165	3.2 ± 0.4
甘草水提物	8	39	17	21	76	4	157	3.2 ± 0.3
	16	35	24	18	66	9	152	3.0 ± 0.2
	32	31	28	12	59	4	134	2.7 ± 0.4
环磷酰胺	0.04	82	68	45	184	43	422	$8.5 \pm 0.6^{2)}$

注: ¹⁾其他畸形包括尾折叠、双头、双尾等; 与正常组比较²⁾ $P < 0.01$; 观察精子总数均为 5 000 个。

3.3 甘草地上部分对小鼠骨髓细胞微核的影响

甘草地上部分水提物低中高各剂量组的微核率分别为 0.28%, 0.34%, 0.26% (雌性) 和 0.32%, 0.30%, 0.36% (雄性), 正常组与环磷酰胺组的微核率分别为 0.22%, 2.48% (雌性) 和 0.28%, 2.76% (雄性)。各受试物组与溶剂正常组比较, 差异均不明显, 且无剂量关系, 环磷酰胺组较正常组显著升高 ($P < 0.01$); 各剂量组 $\text{PCE}/(\text{PCE} + \text{NCE})$ 均未小于正常组的 20%, 未提示存在骨髓抑制作用。见表 3。结果表明小鼠骨髓细胞微核实验结果为阴性, 未发现遗传毒性。

3.4 甘草地上部分基于炎症模型的安全性评价实验

3.4.1 甘草地上部分对炎症模型大鼠一般情况的影响

实验期间, 实验动物生长发育良好, 体质量

表 1 急性经口毒性小鼠死亡情况

Table 1 Mortality in mice in acute oral toxicity test %

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	雌性小鼠 死亡率	雄性小鼠 死亡率
醇提	128	0	0
水提	128	40	20
水提	96	0	0
大孔树脂 A 富集 分段	266	20	83
大孔树脂 B 富集 分段	537	20	67

3.2 甘草地上部分对小鼠精子畸形率的影响

水提物低、中、高剂量 ($8, 16, 32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组精子畸形率分别为 3.16%, 3.01%, 2.67%, 正常组与环磷酰胺组的畸形率分别为 3.23%, 8.45%。各受试物组与正常组比较, 差异均不明显, 环磷酰胺组与正常组的差异明显 ($P < 0.05$)。实验结果表明, 甘草地上部分水提物对小鼠精子无致畸作用, 未发现遗传毒性。见表 2。

逐周增长, 进食与饮水情况正常。醇提组 3 号鼠腹部皮毛脱落, 其余大鼠被毛浓密有光泽; 动物大小便正常, 只有正常组 2 号大鼠第 22 天腹泻。每日灌胃后大鼠出现短时间唾液过度分泌, 不久恢复正常, 认为是灌胃所致, 应与受试物无关, 未见其他异常反应。无实验动物的死亡。

3.4.2 甘草地上部分对炎症模型大鼠脏器绝对质量与相对质量(脏器指数)的影响

与正常组比较, 醇提组的心重显著降低, 肝重、肝指数、肾指数显著升高 ($P < 0.01$), 其余无明显差异。经过个体分析, 正常组 4 号鼠、模型组 6 号鼠胸腺指数异常高; 水提组 5 号鼠的脾指数、肝指数、胸腺指数异常高, 水提物 2 号鼠的肾指数异常高, 胸腺指数异常低; 醇提组 2 号鼠肝指数异常高, 胸腺指数异常低, 此处的异常为不在 $\bar{x} \pm s$ 范围内。见表 4。

表 3 甘草地上部分水提物对小鼠骨髓红细胞微核发生率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of WE on incidence of bone marrow micronucleus in mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

性别	组别	剂量 /g·kg ⁻¹	NCE/个	[PCE/ (PCE + NCE)] %	微核	
					微核数/个	微核率/%
雌性	正常	-	826	54.7 ± 2.1	11	2.2 ± 0.9
	甘草水提	8	779	56.2 ± 3.8	14	2.8 ± 1.6
		16	803	55.4 ± 2.6	17	3.4 ± 2.7
		32	835	54.4 ± 1.7	13	2.6 ± 1.4
		环磷酸胺	0.04	1 031	48.9 ± 3.2	124
雄性	正常	-	756	56.9 ± 1.8	14	2.8 ± 2.2
	甘草水提	8	798	55.6 ± 1.3	16	3.2 ± 1.6
		16	814	55.1 ± 2.9	15	3.0 ± 1.8
		32	871	53.4 ± 1.1	18	3.6 ± 2.5
		环磷酸胺	0.04	1 168	47.1 ± 2.7	138

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 4, 5 同); PCE 均为 1 000 个; 微核观察 PCE 均为 5 000 个。

表 4 甘草地上部分醇提物对大鼠脏器绝对质量与相对质量(脏器指数)的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of WE and *Glycyrrhiza uralensis* alcohol extract(AE) on absolute organ weight and organ/body weight ratios of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	心重 /g	心指数	肝重 /g	肝指数	脾重 /g	脾指数	肾重 /g	肾指数
正常	-	1.38 ± 0.10	0.29 ± 0.02	11.82 ± 0.76	2.56 ± 0.11	0.88 ± 0.13	0.18 ± 0.02	3.06 ± 0.21	0.66 ± 0.05
模型	-	1.31 ± 0.06	0.27 ± 0.02	12.53 ± 0.72	2.62 ± 0.11	0.78 ± 0.09	0.17 ± 0.02	2.99 ± 0.17	0.63 ± 0.04
水提	6.4	1.35 ± 0.14	0.29 ± 0.02	12.19 ± 1.44	2.56 ± 0.28	0.81 ± 0.14	0.18 ± 0.03	3.03 ± 0.25	0.65 ± 0.03
醇提	7.8	1.25 ± 0.05 ²⁾	0.28 ± 0.02	12.78 ± 0.28 ²⁾	2.78 ± 0.22 ²⁾	0.80 ± 0.08	0.17 ± 0.02	3.27 ± 0.14	0.71 ± 0.05 ²⁾

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	胸腺重 /g	胸腺指数	肾上腺重 /g	肾上腺指数	睾丸重 /g	睾丸指数	附睾重 /g	附睾指数
正常	-	0.34 ± 0.08	0.07 ± 0.02	0.056 ± 0.007	0.011 ± 0.001	3.26 ± 0.25	0.69 ± 0.05	1.06 ± 0.04	0.22 ± 0.01
模型	-	0.36 ± 0.06	0.08 ± 0.01	0.060 ± 0.008	0.012 ± 0.002	3.27 ± 0.25	0.70 ± 0.06	1.07 ± 0.07	0.23 ± 0.01
水提	6.4	0.31 ± 0.07	0.07 ± 0.01	0.057 ± 0.007	0.012 ± 0.001	3.31 ± 0.15	0.73 ± 0.04	1.08 ± 0.07	0.24 ± 0.02
醇提	7.8	0.32 ± 0.11	0.07 ± 0.02	0.050 ± 0.007	0.011 ± 0.001	3.49 ± 0.37	0.74 ± 0.02	1.06 ± 0.10	0.24 ± 0.03

3.4.3 甘草地上部分对炎症模型大鼠血生化指标的影响 与正常组比较,模型组大鼠尿素氮(BUN),血糖(GLU)明显升高($P < 0.05$),水提组大鼠的球蛋白(GLB),血肌酐(SCr)明显升高($P < 0.05$),醇提组大鼠的GLU, GLB, SCr明显升高($P < 0.05, P < 0.01$)。模型组大鼠的BUN升高现象在别组并没有出现,而醇提组大鼠的GLU升高现象与模型组一致,认为是造模所致,应与受试物无关。个体分析比较,水提组4号鼠门冬氨酸氨基转移酶(AST)异常升高,水提组5号鼠GLB, AST异常高,水提组8号鼠GLB, 丙氨酸氨基转移酶(ALT)异常高,醇提组2号鼠GLB, ALT, AST异常高,醇提组5号鼠AST异常高。水提组与醇提组大鼠GLB与

SCr的异常升高,提示受试物对大鼠肝脏和肾脏的不良影响。见表5。

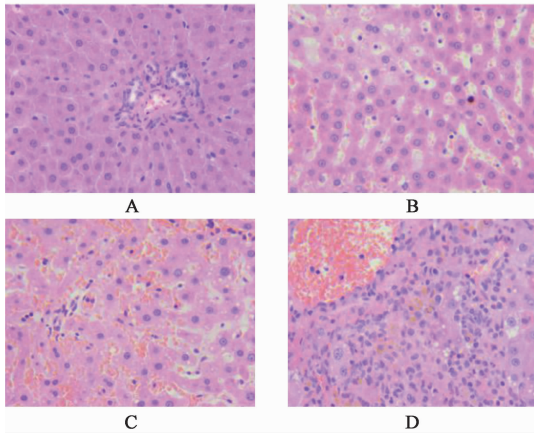
3.4.4 甘草地上部分对炎症模型大鼠脏器外观与组织病理学的影响 对所有大鼠大体解剖尸检记录肉眼可见病变,发现模型组5号鼠、水提组3号鼠脾脏一侧表面出现黄白色硬质凹陷,切片HE染色后组织病理学观察发现区域性瘢痕组织,应与受试物无关;水提组4号,5号,8号与醇提组2号鼠的肝脏出现黄黑色或暗紫色斑块,面积约1 cm²,组织病理学检查显示,4只鼠均有轻度肝细胞脂肪变性以及灶状坏死,门静脉周围发现炎性细胞浸润,表现出较为一致的肝病变,提示存在潜在肝脏毒性。组织病理学未见肾脏病变,其余脏器亦均未发现异常。见图1。

表 5 甘草地上部分对大鼠血生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 Effect of WE and AE on blood biochemical indexes of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	白球比 (A/G)	GLB /g·L ⁻¹	白蛋白 (ALB) /g·L ⁻¹	碱性磷酸酶 (ALP)/U·L ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹	AST /U·L ⁻¹	BUN /mmol·L ⁻¹	胆固醇 (CHO) /mmol·L ⁻¹
正常	-	1.23 ± 0.06	23.39 ± 1.62	29.18 ± 1.54	150.7 ± 30.09	54.67 ± 15.20	168.6 ± 43.79	7.24 ± 0.83	1.62 ± 0.31
模型	-	1.17 ± 0.05	24.83 ± 1.68	29.04 ± 1.42	159.1 ± 40.05	45.30 ± 11.25	136.3 ± 23.76	9.13 ± 1.53 ¹⁾	1.60 ± 0.28
水提	6.4	1.07 ± 0.14 ¹⁾	28.17 ± 3.06 ²⁾	29.72 ± 1.45	142.0 ± 51.11	53.08 ± 19.63	153.1 ± 73.55	7.51 ± 1.65	1.37 ± 0.28
醇提	7.8	1.09 ± 0.05	27.46 ± 1.91 ¹⁾	29.75 ± 1.81	126.8 ± 30.56	63.43 ± 14.68	171.6 ± 99.28	7.38 ± 1.66	1.31 ± 0.40

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	肌酸激酶 (CK)/U·L ⁻¹	SCr /μmol·L ⁻¹	GLU /mmol·L ⁻¹	O/P	总胆红素 (TBIL) /μmol·L ⁻¹	甘油三脂 (TG) /mmol·L ⁻¹	总蛋白 (TP) /g·L ⁻¹
正常	-	681.5 ± 233.7	18.29 ± 4.29	8.29 ± 1.63	3.05 ± 0.51	1.47 ± 0.41	0.34 ± 0.15	53.52 ± 2.55
模型	-	736.1 ± 336.8	20.27 ± 3.58	12.55 ± 0.50 ²⁾	3.32 ± 0.84	1.13 ± 0.23	0.31 ± 0.10	53.87 ± 2.93
水提	6.4	452.9 ± 228.6	26.36 ± 4.26 ¹⁾	8.33 ± 0.63	2.84 ± 0.42	1.46 ± 0.62	0.29 ± 0.08	56.15 ± 2.50
醇提	7.8	658.0 ± 226.7	28.40 ± 5.62 ¹⁾	13.09 ± 2.63 ²⁾	2.73 ± 0.86	1.09 ± 0.22	0.34 ± 0.08	57.21 ± 3.52



A. 正常组肝脏; B. 醇提组 2 号鼠肝脏; C. 水提组 5 号鼠肝脏; D. 水提组 8 号鼠肝脏

图 1 甘草地上部分对大鼠肝脏组织的影响 (HE, ×400)

Fig. 1 Effect of WE and AE on liver tissue of rats (HE, ×400)

4 讨论

近年来,以中药为代表的天然药物在中外医疗和保健上的应用愈发广泛,具有“多成分、多靶点”的优势,但随着大众的医药安全意识增强和监测机制的不断完善,其安全性问题日渐突显,成为影响中医药国际化、现代化的关键因素之一。甘草地上部分作为中药甘草的非传统用药部位,具有独特的开发潜力。贾世山等^[11]较早的发现了乌拉尔宁和乌拉尔醇等甘草地上部分的特征性异戊烯基黄酮成分。异戊烯基结构增加了此类黄酮的亲脂性,使之对生物膜的吸附性增加,与靶蛋白的相互作用增强,故拥有广泛的生物活性,尤其在干细胞分化、抗炎和免疫调节、心血管保护、抗肿瘤及生殖作用等

方面^[12]。例如天然异戊烯基黄酮淫羊藿素既可抑制关键雄激素受体调控基因和雄激素受体剪接变体调控基因的转录,又可与芳烃受体结合来介导泛素-蛋白酶体系统在机制上促进雄激素受体的降解,阻碍前列腺癌细胞的活化,以此共同达到对雄激素依赖型前列腺癌的治疗作用^[13]。但同时异戊烯基黄酮又具有线粒体毒性而致细胞死亡,使开发面临挑战^[14]。因此,如何找到安全性好、活性高的异戊烯基黄酮是今后药用植物活性成分研发的重难点,甘草地上部分正是其中一个条件优越、优势突出的原料来源。

由于对甘草地上部分的系统安全性研究少,欠缺基础毒性资料,本研究通过参考相关法规和文献资料^[15-18],结合病证毒理学^[19]的理念,以急性毒性实验、红细胞微核实验、精子畸形实验、炎症模型大鼠安全性实验来综合评价甘草地上部分整体和部分的的安全性。

急性毒性实验中,甘草地上部分水提物大剂量下可致小鼠部分死亡,醇提物的安全性较水提物为高,水提物与醇提物的最大耐受量均 > 96 g·kg⁻¹,属无毒级;醇提物经富集除杂后纯度大幅提高,在黄酮含量上得到体现,富集物组给予的生药量远高于粗提物组,显示出更明显的毒性亦为合理,同时发现对小鼠的毒性有性别差异,雄性死亡率明显高于雌性,且该结果可重复,推测与豆科植物中普遍存在的异黄酮类物质和甘草地上部分特征性的异戊烯基黄酮类物质的类雌激素作用有关^[20],有待进一步验证。两项遗传毒性实验结果均为阴性,表明目前

条件下未发现甘草地上部分水提物对小鼠精子的致畸作用和对骨髓红细胞的致微核作用。基于炎症模型的安全性实验中,水提组大鼠血清中的球蛋白与血肌酐较正常组显著升高,怀疑肝脏炎症以及肾小球滤过功能的受损,解剖时发现3例肝脏病变,组织病理学检查确认存在肝细胞变性坏死与肝组织炎症,并且对应个体大鼠的氨基转移酶、球蛋白、肝指数和胸腺指数均异常升高。醇提组大鼠血清中的球蛋白与血肌酐同样显著升高,同时肝脏指数、肾脏指数、心脏绝对重量显著升高,解剖发现1例与水提物类似的肝病变,对应个体大鼠亦出现与水提物组病变大鼠一致的生化指标与组织病理学的异常。因此,在肉眼可见病变比例方面水提物组较高,在生化指标和脏器指数上异常方面醇提物组更明显,两者均显示出不同程度的潜在肝肾毒性,有待进一步实验验证;因模型组未出现类似情况,故可以排除手术造模的因素。唾液的过度分泌系灌胃给药所致,与受试物无关;在大鼠血糖异常方面,醇提组与模型组一致,推测或与病症模型有关,可认为与受试物无关。

综上所述,甘草地上部分急性毒性分级属无毒级,相当于成年人的日致死剂量 > 500 g,因目前研究不够深入,尚未制定出人的参考用量;研究未发现甘草地上部分对小鼠的遗传毒性;30 d 重复经口给药对大鼠有潜在毒性,肝肾为可能的毒性靶器官,但不排除实验动物的个体差异,故需后续实验重复验证。在目前未得到甘草地上部分完整详细安全性信息的情况下,不建议长期食用,以免为健康埋下隐患。为使潜在毒性明晰化,后续将深入对甘草地上部分的毒性反应特征、毒性物质基础和毒性机制的研究,并找到安全合理的人体推荐剂量,为其合理开发奠定理论基础。

[参考文献]

[1] Isbrucker R A, Burdock G A. Risk and safety assessment on the consumption of licorice root (*Glycyrrhiza* sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin [J]. *Regul Toxicol Pharm*, 2006, 46(3): 167-192.

[2] 雍晓静,刘钢. 宁夏乌拉尔甘草地上资源的开发利用[J]. *资源开发与市场*, 2004, 20(5): 381-382.

[3] 郭忠军,麻常娟. 甘草地上部分黄酮研究概况[J]. *航空航天医药*, 2005, 16(1): 62-64.

[4] 张学静. 甘草茎叶及根中黄酮和多糖类成分积累动

态研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2009.

[5] 康雪芳,李红丽,王文全,等. 甘草地上部分脂溶性总黄酮抗氧化活性研究[J]. *环球中医药*, 2016, 9(5): 567-570.

[6] 郑巧云. 甘草叶提取物抗慢性非细菌性前列腺炎作用的研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2011.

[7] 李红丽,康雪芳,吴宏辉,等. 甘草地上部分水提液总黄酮纯化工艺研究[J]. *湖北中医药大学学报*, 2017, 19(5): 39-42.

[8] 张鲁,张媛,王文全,等. 甘草地上部分总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2018, 20(4): 55-59.

[9] XIE J H, CHEN Y L, WU Q H, et al. Gastro protective and anti-*Helicobacter pylori* potential of herbal formula HZJW: safety and efficacy assessment [J]. *BMC Complem Altern M*, 2013, 13(1): 119-119.

[10] GB15193. 5-2014 食品安全国家标准[S]. 2014: 2-4.

[11] 贾世山,马超美,王建民. 甘草叶中黄酮类成分的化学研究[J]. *药学学报*, 1990(10): 758-762.

[12] 党延启,段菊,倪荣镇,等. 异戊烯基黄酮的生物活性及构效关系[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(17): 213-218.

[13] SUN F, Indran I R, ZHANG Z W, et al. A novel prostate cancer therapeutic strategy using icaritin-activated arylhydrocarbon-receptor to co-target androgen receptor, and its splice variants [J]. *Carcinog*, 2015, 36(7): 757-768.

[14] Wätjen W, Weber N, LOU Y J, et al. Prenylation enhances cytotoxicity of apigenin and liquiritigenin in rat H4IIE hepatoma and C6 glioma cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45(1): 119-124.

[15] 国家卫计委关于印发《新食品原料申报与受理规定》和《新食品原料安全性审查规程》的通知[J]. *中国食品卫生杂志*, 2014, 26(1): 13.

[16] 朱周靓,严峻,郑云燕,等. 杜仲叶安全性的毒理学评价[J]. *浙江预防医学*, 2017, 29(5): 443-448.

[17] 廖萍. 白木香叶提取物毒理学安全性评价的实验研究[D]. 长沙:中南大学, 2014.

[18] 黄郑隽,阙慧卿,彭华毅,等. 雷公藤内酯醇对雄性大鼠的生殖毒性及其机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(23): 4655-4659.

[19] 王伽伯,崔鹤蓉,柏兆方,等. 精准医学下的中药安全性评价策略和方法: 病证毒理学[J]. *药学学报*, 2016, 51(11): 1681-1688.

[20] Kang H K, Choi Y H, Kwon H, et al. Estrogenic/ antiestrogenic activities of a *Epimedium koreanum* extract and its major components: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(8): 2751-2759.

[责任编辑 张丰丰]