

中药研究

香鳞毛蕨 95% 乙醇提取物的急性毒性研究

朱冲冲 彭 冰 曾祖平 韩旭阳 王 宏 王天国

(首都医科大学附属北京中医医院北京市中医研究所, 北京, 100010)

摘要 目的:探讨香鳞毛蕨 95% 乙醇提取物对小鼠的急性毒性。方法:采用健康昆明种小鼠,灌胃给予香鳞毛蕨 95% 乙醇提取物,给药剂量范围为 10.00 g/kg ~ 24.00 g/kg,观察小鼠中毒症状并记录死亡动物情况,采用 Bliss 法测定半数致死量(LD₅₀, Median Lethal Dose);灌胃给予香鳞毛蕨 95% 乙醇提取物,给药剂量分别为 32 g/kg、16 g/kg、8 g/kg,对各组小鼠进行生化检查和病理组织形态学检查。结果:香鳞毛蕨 95% 乙醇提取物的小鼠 LD₅₀ 为 13.53 g/kg;病变部位为心肌凝固性坏死,肾皮质、髓质内可见肾小管变性坏死脱落,肝细胞轻度肿胀,空泡变性,脾脏及肺脏等未见明显病变。结论:香鳞毛蕨 95% 乙醇提取物具有一定的毒性。

关键词 香鳞毛蕨;急性毒性;LD₅₀

Acute Toxicity of 95% Ethanol Extracts from *Dryopteris fragrans* (L.) Schott

Zhu Chongchong, Peng Bing, Zeng Zuping, Han Xuyang, Wang Hong, Wang Tianyuan

(Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine

Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010, China)

Abstract Objective: To study the acute toxicity of 95% ethanol extracts from *Dryopteris fragrans* (L.) Schott in mice. **Methods:** The *Dryopteris fragrans* 95% ethanol extracts were given to the healthy Kunming mice by intragastric administration. The dose range of 95% ethanol extracts were 10.00 g/kg ~ 24.00 g/kg. The movement and toxic symptoms were observed and the number of dead mice were recorded. LD₅₀ were calculated by Bliss' method. Pathological changes were examined by pathological section. **Results:** LD₅₀ of the 95% ethanol extracts were 13.53 g/kg, respectively. Pathological section indicated that the myocardial coagulation necrosis, renal tubular degeneration and necrosis, and mild swelling of liver cells, vacuole degeneration, while other organs such as the spleen and lung were with no significant pathological changes. **Conclusion:** The 95% ethanol extracts of *Dryopteris fragrans* possesses certain toxicity.

Key Words *Dryopteris fragrans* (L.) Schott; Acute toxicity; LD₅₀

中图分类号:R285;R282.71 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.09.048

香鳞毛蕨 *Dryopteris fragrans* (L.) Schott 是鳞毛蕨科 Dryopteridaceae 鳞毛蕨属 *Dryopteris* Adans. 植物,多生长于高寒地区的滑石坡、森林中的碎石坡和火山周围的岩浆缝隙中,主要分布于我国东北、华北各省,俄罗斯、日本、朝鲜以至欧洲、北美洲亦都有分布^[1]。间苯三酚类化合物是鳞毛蕨属植物的特征性化学成分,也是产生药理活性的主要成分,有研究发现香鳞毛蕨 95% 乙醇提取物中间苯三酚类含量最高^[2-3]。范华倩^[2]等发现香鳞毛蕨 95% 乙醇提取液中间苯三酚含量最高,且对红色毛癣菌、犬子孢子菌等有一定的抑制作用。樊锐锋等^[4]发现间苯三酚类衍生物含量越高,香鳞毛蕨提取物抑菌效果越好。

香鳞毛蕨的化学成分结构类型主要有间苯三酚

类、萜类、黄酮类等。目前对香鳞毛蕨的生物活性研究主要集中在抗肿瘤^[5-9]、抗菌^[10-14]、抗氧化^[15]、抗炎^[16]及治疗皮肤病^[17]等方面,未见对其毒性研究的报道。本课题前期实验中发现香鳞毛蕨水提物和香鳞毛蕨 30% 乙醇提取物对小鼠无毒性,其 60% 乙醇提取物及 95% 乙醇提取物对小鼠有一定的毒性,且 95% 乙醇提取物毒性相比 60% 乙醇提取物毒性更大,因此,本研究进行了对香鳞毛蕨 95% 乙醇提取物的急性毒性研究,为其安全合理使用提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康昆明种小鼠,雌雄各半,18 ~ 22

基金项目:北京市自然科学基金项目(7144200)

作者简介:朱冲冲(1990.01—),男,硕士研究生,研究方向:中药化学,E-mail:1004410653@qq.com

通信作者:彭冰(1978.04—),男,博士,副研究员,研究方向:中药药效物质及质量标准研究,E-mail:pengbing126@126.com

g,由中国食品药品检定研究院提供,动物许可证编号 SCXK(京)20140013。小鼠在 SPF 级动物室适应性饲养 2 d,自由摄食、饮水,室温 22 ~ 26 ℃,湿度 30% ~ 50%。

1.1.2 药物 香鳞毛蕨采自黑龙江省五大连池地区,由北京中医药大学中药学院高增平教授鉴定为 *Dryopteris fragrans* (L.) Schott, 凭证标本 (DF0110801)保存于北京市中医研究所。

取香鳞毛蕨粗粉适量,加 12 倍 95% 乙醇,浸 0.6 h,超声提取 0.6 h,抽滤,减压浓缩至无醇味,加入 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液制成含生药 2 g/mL 的混悬液,依次稀释得各浓度混悬液。

1.1.3 试剂与仪器 羧甲基纤维素钠(F20070608,国药集团化学试剂有限公司);尿素氮(BUN,20160526,英科新创(厦门)科技有限公司);谷丙转氨酶(ALT,20160526,英科新创(厦门)科技有限公司);谷草转氨酶(AST,20160526,英科新创(厦门)科技有限公司);肌酐(CR,20160615,北京科美生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 60 只健康昆明小鼠随机分为 6 组,每组 10 只,雌雄各半,分别为:空白对照组,香鳞毛蕨 95% 乙醇提取物 24.00 g/kg 组,19.20 g/kg 组,15.36 g/kg 组,12.29 g/kg 组,10.00 g/kg 组。采用 Bliss 计算半数致死量(LD₅₀)及 95% 可信区间。

40 只健康昆明小鼠水机分为 4 组,每组 10 只,雌雄各半,分别为:空白对照组,香鳞毛蕨 95% 乙醇提取物 32 g/kg 组(H),16 g/kg 组(M),8 g/kg 组(L)。进行组织病理学检查和血清生化检测。

1.2.2 给药方法 实验前禁食不禁水 16 h,次日日上午灌胃给药 1 次,按体积 40 mL/kg 小鼠体重灌胃。空白对照组灌胃等量 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液,其他各给药组分别灌胃各对应浓度药物,常规饲养,连续观察 8 d,记录动物反应及死亡情况。

1.2.3 取材与检测方法 对死亡的动物及时进行解剖尸检,肉眼观察各脏器,记录病变情况。取其心、肝、脾、肺、肾脏,经 10% 福尔马林固定,常规石蜡包埋切片,HE 染色,显微镜下进行形态学检查;未死亡小鼠取血,37 ℃ 静置 0.5 h,低温离心(10 min,3 000 r/min),取上清液,上清液中检测 BUN、CR、ALT、AST 含量。

1.3 统计学方法 运用 SPSS 17.0 软件,对数据做正态性检验和方差齐性检验,两项均符合,采用单因素方差分析进行统计计算。以 $P < 0.05$ 为差异有统

计学意义。

2 结果

2.1 香鳞毛蕨 95% 醇提物组毒性反应 灌胃给药后,95% 醇提物组小鼠活动明显减少,出现倦怠、呼吸加速、反应迟钝、运动失衡等症状,10 min 后小鼠开始出现死亡,小鼠死亡多集中在 0.5 ~ 1 h,所有死亡小鼠均在给药当天死亡,且死亡前大多伴阵发性抽搐。给药第 2 天以后未发现小鼠死亡,未死亡小鼠与空白组小鼠相比呈现较明显抑制状态,随时间延长小鼠饮食、体重逐渐恢复正常。

2.2 香鳞毛蕨 95% 乙醇提取物组 LD₅₀ 及 95% 可信区间 根据各剂量组小鼠累计死亡数及给药剂量,采用 Bliss 法计算香鳞毛蕨 95% 醇提物组 LD₅₀ 及 95% 可信区间。见表 1。香鳞毛蕨 95% 乙醇提取物的小鼠 LD₅₀ 为 13.53 g/kg,95% 可信区间为 11.971 ~ 15.155 g/kg。

表 1 香鳞毛蕨 95% 乙醇提取物对小鼠 LD₅₀ 测定结果

组别	剂量 (g/kg)	动物数 (只)	死亡数 (只)	死亡率 (%)	LD ₅₀ (g/kg)	95% 可信区间 (g/kg)
空白对照组	—	10	0	0	—	—
香鳞毛蕨 95% 醇提物组	24.00	10	10	100	13.53	11.971 ~ 15.155
	19.20	10	9	90		
	15.36	10	7	70		
	12.29	10	5	50		
	10.00	10	0	0		

注:“—”表示无数据

2.3 血清生化检查 对香鳞毛蕨 95% 乙醇提取物组小鼠和空白对照组小鼠血清进行生化检查发现,95% 醇提物中剂量组小鼠血清中 ALT、BUN 与空白组小鼠比较差异有统计学意义,低剂量组小鼠血清与空白组比较差异无统计学意义,而 95% 乙醇提取物组小鼠血清中 AST、CR 与空白组小鼠比较差异均无统计学意义。见图 1。

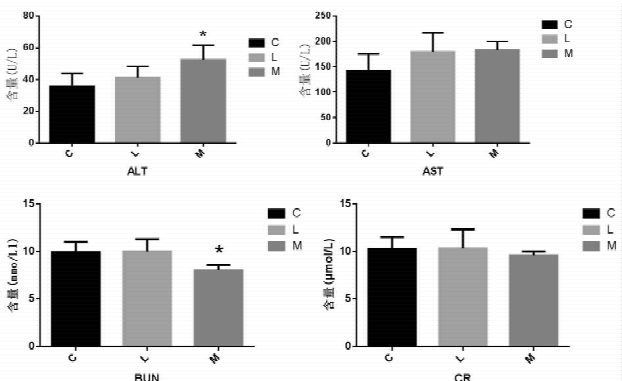


图 1 各组小鼠血清生化指标

注:“C”:空白对照组;“L”:香鳞毛蕨 95% 乙醇提取物低剂量组;“M”:香鳞毛蕨 95% 乙醇提取物中剂量组 “*”: $P < 0.05$

2.4 组织病理学检查 各组动物的脾脏、肺脏等脏器均未见明显病变;骨髓淋巴组织脾小结明显,外部边缘区淋巴细胞增生,红髓髓索清楚,其间髓窦充满红细胞并伴多核巨细胞增生;肺泡壁毛细血管充有红细胞。各级支气管周围间质有肺动、静脉、淋巴组织和疏松结缔组织。肺泡充气良好。香鳞毛蕨 95% 乙醇提取物组小鼠心肌凝固性坏死;肝细胞轻度浊肿,空泡变性,并可见出血坏死;肾皮质、髓质内可见肾小管变性坏死脱落,肾小血管周围炎细胞浸润。见图 2。

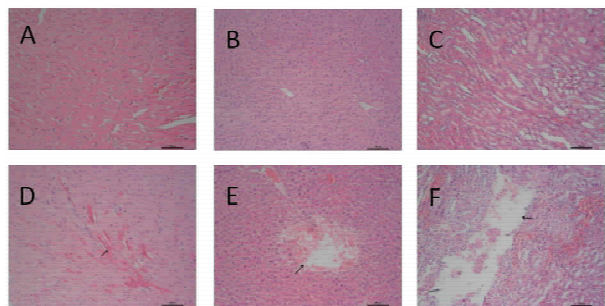


图 2 香鳞毛蕨急性毒性病理切片(物镜 100 ×)

注:A. 空白对照组心脏;B. 空白对照组肝脏;C. 空白对照组肾脏;D. 香鳞毛蕨 95% 醇提取物高剂量组(32.00 g/kg),箭头指示为心肌凝固性坏死;E. 香鳞毛蕨 95% 醇提取物高剂量组(32.00 g/kg),箭头指示为肝出血坏死;F. 香鳞毛蕨 95% 醇提取物高剂量组(32.00 g/kg),箭头指示为肾小管变性坏死脱落

3 讨论

香鳞毛蕨 95% 乙醇提取物急性毒性实验中,与空白组小鼠比较,各给药组小鼠均出现活动减少,呆滞,运动失衡,呼吸加速等中毒症状,说明香鳞毛蕨 95% 乙醇提取物有一定的毒性,灌胃给药后的 LD_{50} 为 13.53 g/kg,95% 的可信限为 11.971 ~ 15.155 g/kg,根据化学物质急性毒性剂量分级表可知,香鳞毛蕨 95% 乙醇提取物灌胃给药分级为微毒。

研究结果显示:单次大剂量给药香鳞毛蕨 95% 乙醇提取物可引起小鼠心肝肾急性损伤,长期给药是否会造成蓄积损伤及损伤是否可逆还不明确。课题组对香鳞毛蕨 95% 乙醇提取物进行急性毒性研究,可对今后用药有一定指导意义。但是目前香鳞毛蕨毒性物质基础、体内毒性过程、毒性作用特点、毒性作用机制尚不明确,仍有待进一步研究。课题组对香鳞毛蕨 95% 乙醇提取物进行急性毒性研究,对其新药研发有一定指导意义。

参考文献

[1]徐冬英.药用蕨类植物的研究进展[J].中医药信息,1997,14(4):20-21.

- [2]范华倩,沈志滨,陈艳芬,等.香鳞毛蕨不同提取液体外抗真菌作用研究[J].中药材,2012,35(12):1981-1985.
- [3]杜文钊,宋国强,刘海燕,等.香鳞毛蕨中间苯三酚类化合物的研究[J].广东药学院学报,2016,32(1):22-24.
- [4]樊锐锋,黄庆阳,常纓.香鳞毛蕨抑菌特性比较[J].东北农业大学学报,2012,43(3):81-84.
- [5]Zhang Y, Luo M, Zu Y, et al. Dryofragin, a phloroglucinol derivative, induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through ROS-mediated mitochondrial pathway[J]. Chem Biol Interact, 2012, 199(2):129-136.
- [6]Sun Y, Gao C, Luo M, et al. Aspidin PB, a phloroglucinol derivative, induces apoptosis in human hepatocarcinoma HepG2 cells by codulating PI3/Akt/GSK3 β pathway[J]. Chem Biol Interact, 2013, 201(1-3):1-8.
- [7]Zhao DD, Zhao QS, Liu L, et al. Compounds from *Dryopteris fragrans* (L.) Schott with Cytotoxic Activity[J]. Molecules, 2014, 19(3):3345-3355.
- [8]Song R, Li G, Li S. Aspidin PB, a novel natural anti-fibrotic compound, inhibited fibrogenesis in TGF- β 1-stimulated keloid fibroblasts via PI-3K/Akt and Smad signaling pathways[J]. Chem Biol Interact, 2015, 238:66-73.
- [9]Wan D, Jiang C, Hua X, et al. Cell cycle arrest and apoptosis induced by aspidin PB through the p53/p21 and mitochondria-dependent pathways in human osteosarcoma cells[J]. Anticancer Drugs, 2015, 26(9):931-941.
- [10]Gao C, Guo N, Li N, et al. Investigation of antibacterial activity of aspidin BB against *Propionibacterium acnes*[J]. Arch Dermatol Res, 2016, 308(2):79-86.
- [11]Li N, Gao C, Peng X, et al. Aspidin BB, a phloroglucinol derivative, exerts its antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* by inducing the generation of reactive oxygen species[J]. Res Microbiol, 2014, 165(4):263-272.
- [12]黄奕曦,沈志滨,江涛,等.香鳞毛蕨有效部位对红色毛癣菌体外抗真菌的作用[J].广东药学院学报,2016,32(1):78-82.
- [13]王洁,唐春萍,江涛,等.香鳞毛蕨有效部位对糠秕马拉色菌的体外抗真菌作用研究[J].中成药,2015,37(3):642-645.
- [14]万江帆,沈志滨,江涛,等.香鳞毛蕨有效部位对申克孢子丝菌酵母相的体外抗真菌作用研究[J].中药新药与临床药理,2014,25(1):44-48.
- [15]Li XJ, Wang W, Luo M, et al. Solvent-free microwave extraction of essential oil from *Dryopteris fragrans* and evaluation of antioxidant activity[J]. Food Chem, 2012, 133(2):437-444.
- [16]Peng B, Bai RF, Han XY, et al. Two new glycosides from *Dryopteris fragrans* with anti-inflammatory activities[J]. J Asian Nat Prod Res, 2016, 18(1):59-64.
- [17]殷先君.香鳞毛蕨治疗 48 例难治性手足癣的疗效观察[J].现代药物与临床,2013,28(1):57-58.