

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.07.07

牛蒡苷元及牛蒡子提取物的急性毒性试验研究

何 斌¹, 冉志平¹, 周 琦¹, 张海静³, 杨文海¹, 邵志勇¹, 吴利军¹, 陈夏冰¹, 陈 洁¹, 操继跃^{2*}

(1. 武汉市农业科学院畜牧兽医研究所, 武汉 430208; 2. 华中农业大学, 武汉 430070;

3. 天津市宝坻区畜牧水产产业发展服务中心, 天津 301800)

[收稿日期] 2019-02-01 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 07-0044-05 [中图分类号] S853.74

[摘 要] 为评价牛蒡苷元及牛蒡子提取物在兽医临床使用中的安全性, 根据兽药急性毒性试验 (LD₅₀ 测定) 指导原则的要求, 开展了牛蒡苷元及牛蒡子提取物在 SPF 级昆明小鼠经口给药的急性毒性试验研究。试验结果表明: 小鼠灌胃给予牛蒡苷元的半数致死量为 219.8 mg/kg, 死亡均发生在 3 h 以内, 存活动物均正常生长; 鼠灌胃给予牛蒡子提取物后采用最大耐受量法测定发现, 给药组与对照组雌雄小鼠生长良好, 在 14 d 观察期内均未出现明显中毒症状和死亡情况, 药物急性经口 MTD ≥ 36 g/kg.bw; 根据兽药指导原则经口给药急性毒性试验剂量分级标准, 牛蒡苷元属中等毒级, 牛蒡子提取物为实际无毒级。

[关键词] 牛蒡苷元; 牛蒡子提取物; 昆明小鼠; 急性毒性

Study on Acute Toxicity of Arctiin and Burdock Seed Extract

HE Bin¹, RAN Zhi-ping¹, ZHOU Qi¹, ZHANG Hai-Jing³, YANG Wen-Hai¹, SHAO Zhi-Yong¹,
WU Li-Jun¹, CHEN Xia-Bing¹, CHEN Jie¹, CAO Ji-Yue^{2*}

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Wuhan Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430208, China;

2. College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

3. Tianjin baodi district animal husbandry and aquaculture development service center, Tianjin 301800, China)

Corresponding author: CAO Ji-Yue, E-mail: caojiyue@mail.hzau.edu.cn

Abstract: In order to evaluate the safety of arctiin and fructus lappa lappa extract in veterinary clinical use, the acute toxicity test of arctiin and fructus lappa extract in SPF grade Kunming mice was conducted according to the requirements of the veterinary acute toxicity test (LD₅₀ test) guidelines. The results showed that the lethal dose of arctium lappa was 219.8 mg/kg, all the deaths occurred within 3h, and all the surviving animals grew normally. After the mice were given burdock extract by gavage, the method of maximum tolerance was adopted. It was found that both male and female mice in the administration group and the control group grew well, and no obvious poisoning symptoms or death occurred during the 14d observation period. According to the veterinary drug

作者简介: 何 斌, 兽医师, 从事药理与毒理研究。

通讯作者: 操继跃。E-mail: caojiyue@mail.hzau.edu.cn

guidelines for oral administration of acute toxicity test dose grading standards, burdock glycoside is of medium toxic grade, and burdock seed extract is actually non-toxic grade.

Key words: arctiin; burdock seed extract; Kunming mice; acute toxicity

牛蒡子是一种常用中药,具有疏散风热、宣肺透疹功效,临床上用于治疗外感风热、咳嗽气喘、咽喉肿痛等症^[1]。牛蒡苷元为牛蒡子和牛蒡子提取物的直接有效成分^[2],具有抗炎^[3]、抗病毒^[4]、抗肿瘤^[5]、抗糖尿病^[6]等众多药理作用,具有良好的研发和应用前景;目前,国内外未见牛蒡苷元及牛蒡子提取物的安全性评级研究,本文根据兽药指导原则经口给药急性毒性试验要求,研究了牛蒡苷元及牛蒡子水提取物在昆明小鼠体内经口给药后的急性毒性,为新兽药的研发和临床用药提供理论资料,为中兽药现代化进行有意义的探索。

1 材料

1.1 仪器设备 注射器、烧杯、小鼠灌胃针;小鼠独立送风(IVC)系统;手术剪、镊子,JY2002 型电子天平、岛津 AUY2002 型分析天平等。

1.2 药品与试剂 牛蒡苷元:含量 98.12%,由武汉市畜牧兽医科学研究所动物疾病防控学科实验室自制;牛蒡子提取物:牛蒡苷元含量 3.10%,由武汉市畜牧兽医科学研究所动物疾病防控学科实验室自制,使用时,用 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液配制成混悬液;羧甲基纤维素钠:由国药集团化学试剂有限公司生产,使用时,用蒸馏水配制成 0.5% 的水溶液,冷处放置,限 7 d 内使用。二甲亚砜、丙二醇、乙醇:购于国药集团化学试剂有限公司。

1.3 主要溶液的配制 牛蒡苷元溶液的制备:分别准确称取牛蒡苷元 200.0、159.0、126.0、100.0、79.5、63.0、50.0 mg,置于 10 mL 容量瓶中,加入少量二甲亚砜助溶,配制成浓度分别为 20.0、15.9、12.6、10.0、7.95、6.3、5.0 mg/mL 的牛蒡苷元溶液,灌胃前充分摇匀。

0.5% 羧甲基纤维素钠的配制:准确称取 0.5 g 羧甲基纤维素钠,溶解于 100 mL 蒸馏水中,保存于 4℃ 冰箱内,限 7 d 内使用。

牛蒡子提取物的配制:准确称取牛蒡子提取物 15.0 g,溶解于 50 mL 的 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液中,配成均匀混悬液,浓度为 0.3 g/mL,现配现用,灌胃前充分摇匀。

1.4 试验动物 SPF 级昆明种小鼠,120 只,雌雄各半,3~4 周龄,体重 18~22 g,由湖北省实验动物研究中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(鄂)2008-0005。小鼠购买后在实验室动物房内预饲养一周,饲料为全价营养颗粒饲料。

实验动物使用许可证号:SYXK(鄂)2014-0081。整个试验过程中保持室内清洁卫生,空气流通。小鼠每笼 5 只,雌雄分开,自由饮水、采食。室温控制在 20~25℃,相对湿度 40%~70%,照明采用 12 h/12 h 昼夜明暗交替,每周更换 2 次垫料。

2 方法

2.1 动物分组与剂量设计

2.2.1 牛蒡苷元实验组 根据预试验的结果,将 80 只昆明小鼠随机分成 8 组,每组 10 只,雌雄各半。设置 7 个给药组及 1 个空白对照组,给药组剂量分别为 400、318、252、200、159、126、100、0 mg/kg. bw。

2.1.2 牛蒡子提取物实验组 根据急性毒性预试验的结果,没有出现小鼠死亡的情况,故进行最大耐受量(MTD)的测定。将 40 只昆明小鼠随机分成 2 组,为给药组和溶媒对照组,每组 20 只,雌雄各半。按照牛蒡子提取物能溶解的最大浓度 0.3 g/mL(同时药液能通过灌胃针管),小鼠的最大灌胃给药体积 0.4 mL/10 g. bw 给药,24 h 内灌胃 3 次,3 次累计给予 1.2 mL/10 g. bw,相当于牛蒡子提取物 36 g/kg. bw,作为给药组。溶媒对照组给予等体积 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液。

2.2 给药

2.2.1 牛蒡苷元实验组 给药前 12~16 h 动物禁食不禁水,牛蒡苷元实验各组均按照 0.2 mL/10 g. bw

的给药体积进行一次灌胃给药;给药后 2 h 给予饲料,自由饮水。

2.2.2 牛蒡子提取物实验组 给药组小鼠灌胃给予牛蒡子提取物药液(0.3 g/mL,0.4 mL/10 g, bw),抽取药液时始终进行搅拌,溶媒对照组给予等体积的 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液,首次给药后 2 h 给予饲料,自由饮水。24 h 内给药 3 次,每次间隔时间 6 h。

2.3 试验结果观察

2.3.1 牛蒡苷元实验组 给药后仔细观察和详细记录小鼠出现的毒性反应症状及开始和消失时间,记录小鼠的死亡数目及死亡时间。对小鼠进行灌胃给药后连续观察 8 h,以后每天观察记录 2 次,连续观察 14 d。观察并记录小鼠毛色、眼睛、分泌物、排泄物、呼吸、自主活动与中枢神经系统行为等的变化情况以及小鼠死亡时间和死亡表现,对所有死亡或处死小鼠进行尸检。

2.3.2 牛蒡子提取物实验组 3 次给药间隔期间连续观察小鼠的反应,最后一次给药后再连续观察 4~6 h,以后每天观察记录 2 次,连续观察 14 d。详细观察并记录小鼠给药后的反应,包括:神经系统方面:行为及反应(姿势变化、不正常叫声、烦躁不安、呆滞等)、运动(肌肉抽搐、运动失调、强迫运动、僵硬等)、瞳孔及分泌物(瞳孔有无缩小或放大、流泪、流涎等)。呼吸及心血管方面:呼吸急促或过缓、心跳过强或过弱、流鼻涕等。胃肠方面:腹部气胀或收缩,腹泻或便秘等。泌尿生殖系统方面:阴户、乳腺肿胀、会阴部污秽等。皮肤和被毛方面:颜色、张力、完整性、有无发红、皮疹等。黏膜和眼方面:有无充血、出血、黏液、眼球突出、震颤或浑浊等。

于给药前和给药最后一天对小鼠称重,并记录。详细记录小鼠出现毒性反应的症状、起始时间、严重程度、持续时间等,记录小鼠死亡数目及死亡时间。在实验结束时对所有小鼠进行大体解剖,肉眼观察各个器官有无异常,并与对照组进行比较,当组织器官出现颜色、质地、体积等改变时,均应记录并进行组织病理学检查,初步判断可能的毒

性靶器官。

2.4 数据统计 实验数据采用 Microsoft Excel 软件建立数据库,以“平均数 ± 标准差”表示各剂量组动物体重,进行方差分析,并按动物性别分别统计。

3 结果与分析

3.1 牛蒡苷元实验组 小鼠在给药后 15 min 内出现明显毒性反应,表现为心跳加快、兴奋、狂躁、惊厥、运动失调等,在出现角弓反张的挣扎后迅速死亡,如图 1。小鼠死亡主要发生在给药后 12 h 内,1 d 后存活小鼠恢复正常。剖检死亡小鼠,胃内充满淡黄色液体,其他脏器未见异常,如图 2。给药后死亡数量见表 1。

根据简化寇氏 LD_{50} 计算方法:

$$LD_{50} = \lg^{-1} [X_m - i(\sum p - 0.5)]$$

$$\text{半数致死量 } LD_{50} = 219.8 \text{ mg/kg}$$

$$LD_{50} \text{ 的 } 95\% \text{ 可信限} = 190.5 - 257.0 \text{ mg/kg}$$



图 1 死亡结果

Fig 1 Death result

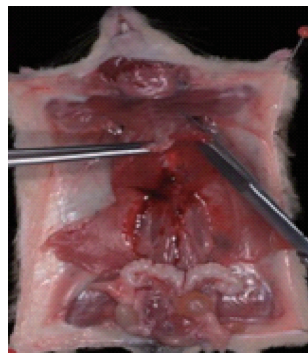


图 2 解剖结果

Fig 2 Anatomical result

表 1 牛蒡苷元灌胃给药后急性毒性死亡数量

Tab 1 Acute oral toxicity test of arctigenin in mice								
剂量 (mg/kg. bw)	动物数 (只)	给药后死亡数(只)						
		3 h	1 d	2 d	3 d	7 d	14 d	总计
400	10	9	0	0	0	0	0	9
318	10	7	0	0	0	0	0	7
252	10	6	0	0	0	0	0	6
200	10	5	0	0	0	0	0	5
159	10	3	0	0	0	0	0	3
126	10	1	0	0	0	0	0	1
100	10	0	0	0	0	0	0	0
0	10	0	0	0	0	0	0	0

牛蒡苷元急性经口毒性试验结果表明:小鼠灌胃给予牛蒡苷元的半数致死量为 219.8 mg/kg,死亡均发生在 3 h 以内,存活动物均正常生长。依据兽药指导原则急性毒性分级评价标准规定,牛蒡苷元属中等毒级。

3.2 牛蒡子提取物实验组 给药间隔期间和 14 d 观察期内,各组小鼠精神状况良好,行为活动正常,皮肤和被毛清洁,大小便正常,无异常分泌物,亦未

表 2 采用简化寇氏法计算小鼠口服牛蒡苷元的 LD₅₀及置信区间

Tab 2 Using the simplified Karber's method calculation of mice orally arctigenin LD50 and confidence interval						
剂量 (mg/kg. bw)	对数剂量 (x)	动物数 (n)	死亡数 (r)	死亡率 (p)	存活率 (q)	P * q
400	2.602	10	9	0.9	0.1	0.09
318	2.502	10	7	0.7	0.3	0.21
252	2.401	10	6	0.6	0.4	0.24
200	2.301	10	5	0.5	0.5	0.25
159	2.201	10	3	0.3	0.7	0.21
126	2.100	10	1	0.1	0.9	0.09
100	2	10	0	0	1	0

见其他中毒反应症状。至试验结束时小鼠没有出现死亡情况。

小鼠体重增长正常,给药组与溶媒对照组比较,体重变化差异不显著($P>0.05$)。试验结束时对小鼠进行大体解剖,肉眼观察心、肝、脾、肺、肾等主要脏器,均无异常变化。试验结果见表 3。

表 3 牛蒡子提取物小鼠急性经口毒性试验结果 ($\bar{x} \pm S. D$)

Tab 3 Acute oral toxicity test of Arctii Fructus powder in mice ($\bar{x} \pm S. D$)						
性别	剂量(g/kg. bw)	动物数(只)	动物体重(g)变化		死亡动物数(只)	中毒反应
			初重	终重		
雌	0	10	18.84 ± 1.41	29.75 ± 1.48	0	无明显毒性反应亦无动物死亡
	36	10	18.91 ± 1.18	29.46 ± 0.88	0	
雄	0	10	19.25 ± 1.81	32.18 ± 1.53	0	无明显毒性反应亦无动物死亡
	36	10	19.66 ± 1.80	32.46 ± 1.98	0	

注:给药组与空白组比较, $P>0.05$
Note:Give medicine group compared with the control group, $P>0.05$

采用最大耐受量法(MTD)进行测定牛蒡子提取物急性毒性试验结果表明:牛蒡子提取物的最大药物浓度 0.3 g/mL,小鼠的最大灌胃体积 0.4 mL/10 g. bw,24 h 内进行 3 次灌胃给药,小鼠在 14 d 观察期内均没有出现明显中毒症状及死亡情况,得出该样品的 MTD 值 ≥ 36 g/kg. bw,依据兽药指导原则急性毒性分级评价标准规定,该提取物属实际无毒级^[7]。

4 讨论与结论

急性毒性试验是对动物进行 1 次给药或在 24 h 内进行 2~3 次给药,通过观察动物的中毒症状及死亡情况等指标来判断毒性反应的性质和程度,评价药物的毒性大小的试验。在新药研发过程中,通常要进行急性毒性研究,所得到的结果可以初步探索药物毒性作用大小和靶器官,并为其他毒性试验的剂量设计提供参考。本试验采用昆明种

小鼠进行牛蒡苷元和牛蒡子提取物经口给药的急性毒性试验。

牛蒡苷元预试验过程中,100%致死剂量为 400 mg/kg,0%致死剂量为 100 mg/kg,确定 IV 为 7, r 为 1.26,因此确定各组剂量分别为 400、318、252、200、159、126、100 mg/kg. bw。试验结果表明,小鼠灌胃给予牛蒡苷元的半数致死量为 219.8 mg/kg,死亡均发生在 3 h 以内,存活动物均正常生长,根据小鼠死亡时间和死亡特征,推测牛蒡苷元具有一定的神经毒性,依据兽药指导原则急性毒性分级评价标准规定,牛蒡苷元属中等毒级。牛蒡苷元较一般中草药及中草药提取物急性毒性大,双黄连口服液对小白鼠最小致死量范围为 49.2 ~ 60.8 g/kg,根据中药毒性分级可判断双黄连口服液为小毒^[8];中药复方制剂“归芪饮”灌服给药的 LD₅₀ 为 22.44 g/kg,按照毒理学评价标准,LD₅₀ 大于 10000 mg/kg 即属于无毒物质,从而表明中药复方制剂“归芪饮”安全无毒^[9];银黄连翘散急性毒性试验中,两次重复试验 LD₅₀ 大于 5000 mg/kg,属实际无毒^[10];这表明牛蒡苷元在兽医临床使用中需要注意其急性毒性所带来的危害。

在进行牛蒡子提取物预试验过程中,分别以 36、18、9 g/kg. bw 的剂量进行灌胃给药,结果各剂量组小鼠均未出现死亡情况,且没有表现出毒性症状,说明牛蒡子粉的毒性低,无法进行 LD₅₀ 的测定。故采用最大耐受量法,以预试验的最大剂量 36 g/kg. bw (即牛蒡子粉的最大药物浓度 0.3 g/mL,小鼠的最大灌胃体积 0.4 mL/10g. bw,24 h 内灌胃 3 次,3 次累计给予 1.2 mL/10 g. bw) 作为给药剂量进行灌胃给药,在此剂量下,小鼠生长状况良好,无任何明显中毒症状及死亡情况,小鼠体重增长正常,给药组与对照组相比无显著性差异。试验结束时对小鼠进行大体解剖,各脏器均无形态及颜色异常。试验结果为:雌雄小鼠急性经口 MTD 均 ≥ 36 g/kg. bw,根据兽药研究技术指导原则对急性经口毒性试验的分级标准,牛蒡子粉为实际无毒级,这一研究结果符合中草药绿色、安全的特性,提示其在兽医临床中可长期使用。根据急性毒性试验的结果,可初步评价牛蒡子粉在短期内用药比较安全,为了进一步评价药物的安全性,还需要对其进行长期毒性研究。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 (2015 年版二部) [S]. Commission of Chinese veterinary pharmacopoeia. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia, volume I, 2015 edition [S].
- [2] 齐艳明. 牛蒡化学成分研究 [D]. 齐齐哈尔: 齐齐哈尔大学, 2012. QI Y M. Study on the chemical constituents of burdock [D]. Qiqiha: Qiqihar university, 2012.
- [3] Cho M K, Jang Y P, Kim Y C, *et al.* Arctigenin, a phenylpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits MAP kinases and AP-1 activation via potent MKK inhibition; the role in TNF- α inhibition. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4(10): 1419-1429
- [4] Chen J, Li W T, Jin E G, *et al.* The antiviral activity of arctigenin in traditional Chinese medicine on porcine circovirus type 2. *Research in Veterinary Science*. 2016, 6(106): 159-164
- [5] 张兴德, 张彩琴, 刘启迪, 等. 牛蒡子抗肿瘤活性成分及作用机制研究进展 [J]. 中国现代中药, 2012, 14(12): 12-15. Zhang X D, Zhang X Q, Liu Q D, *et al.* Research progress on antitumor constituents and mechanism of *Arctium lappa* L [J]. *Modern Chinese Medicine*, 2012, 14(12): 12-15.
- [6] 卢来春. 牛蒡子苷分离、纯化及其对实验性糖尿病大鼠血管内皮细胞保护机制的初步探讨 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2007. LU L C. Study on the separation and purification way of Arctiin from *Fructus Arctii* and study on the protective mechanisms on vascular endothelial cell of experimental diabetic rats with Arctiin [D]. Chongqing: Third military medical university, 2007.
- [7] 农业部兽药评审中心. 兽药研究技术指导原则汇编 [S]. Veterinary Drug Evaluation Center of Ministry of Agriculture. Compilation of technical guidelines for veterinary drug research [S].
- [8] 周德刚, 张晓会, 刘兴金, 等. 双黄连口服液的急性毒性试验研究 [J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(12): 29-30. Zhou D G, Zhang X H, Liu X J, *et al.* Research of acute toxicity of Shuanghuanglian Oral Liquid [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2011, 45(12): 29-30.
- [9] 张亚君, 刘文利, 林明明, 等. 中药复方制剂“归芪饮”的急性毒性研究 [J]. 山东畜牧兽医, 2018, 1(252): 9-10. Zhang Y J, Liu W L, Lin M M, *et al.* Acute toxicity of guiqi decoction, a traditional Chinese medicine compound preparation [J]. *Shandong Animal Husbandry and Veterinary*, 2018, 1(252): 9-10.
- [10] 秦志华, 王淑婷, 郭沛, 等. 银黄连翘散的毒理学研究 [J]. 青岛农业大学学报, 2015, 32(4): 260-264. Qin Z H, Wang S T, Guo P, *et al.* Study on toxicology of Yinhuanglianqiao Powder [J]. *Journal of Qingdao Agricultural University*, 2015, 32(4): 260-264.