

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.05.06

牛蒡子提取物长期毒性试验研究

何斌¹, 张海静³, 杨文海¹, 邵志勇¹, 吴利军¹, 陈夏冰¹, 陈洁¹, 金尔光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业发展服务中心, 天津 301800)

[收稿日期] 2019-02-26 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 05-0042-11 [中图分类号] S853.74

[摘要] 为评价牛蒡子提取物在兽医临床使用中的安全性, 根据兽药长期毒性试验指导原则的方法, 对 SPF 级 Wister 大鼠进行了牛蒡子提取物 6、3、1.5 g/kg.bw 剂量灌胃给药的 30 d 长期毒性试验。试验结果表明: 试验各组大鼠活动正常, 精神状态良好, 均未出现死亡情况和明显中毒症状; 牛蒡子提取物给药组与对照组比较, 大鼠体重、进食量、饲料利用率、血常规、血液生化、脏器重量、脏/体比值等指标差异均不显著, 大体解剖均未发现异常, 对高剂量组和空白组进行病理组织学检查并进行病理积分, 两组比较差异不显著, 结果为未发现牛蒡子粉有明显毒性作用。

[关键词] 牛蒡子提取物; Wister 大鼠; 30 d 长期毒性

Study on The Long-term Toxicity of *Arctium lappa* Extract

HE Bin¹, ZHANG Hai-jing³, YANG Wen-hai¹, SHAO Zhi-yong¹, WU Li-jun¹,
CHEN Xia-bing¹, CHEN Jie¹, JING Er-guang¹, 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 *Arctium lappa* extract in veterinary clinical use, the long-term toxicity test of 6, 3 and 1.5 g/kg.bw of *Arctium lappa* extract was conducted in SPF Wister rats according to the guidelines for long-term toxicity test of veterinary drugs. The results showed that the rats in each group had normal activities and good mental state, and no death or obvious poisoning symptoms were found. Extracts from fructus arctii drug group compared with control group, the rat body weight, food intake, feed utilization, routine blood, blood biochemistry, organ, the dirty/body weight ratio index were not significant difference, such as gross anatomy are no abnormalities are found, the high dose group and blank group, histologic examination and pathological integral is similar between the two groups was not significant, the result is not found fructus arctii powder has obvious toxic action.

Key words: *Arctium lappa* extract; Wister rats; long-term toxicity at 30 d

作者简介: 何斌, 从事兽医药理与毒理学研究。

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

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、抗病毒、抗肿瘤、抗糖尿病等众多药理作用^[3-4],具有良好的研发和应用前景;根据兽药长期毒性试验指导原则的方法要求^[5],研究了牛蒡子水提物在 Wistar 大鼠体内经口给药后的 30 d 长期毒性,确定牛蒡子提取物对大鼠的毒性作用性质和靶器官,评价其亚慢性摄入的危险性,为临床试验剂量设计及观察指标的选择提供参考,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,日立 7020 型全自动生化分析仪,迈瑞 BC-2600 全自动血液分析仪。

1.2 药品与试剂 牛蒡子提取物粉:含牛蒡苷元 3.03%,由实验室自制,使用时,用 0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液配制混悬液;

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,放置于 4 ℃冰箱内,限 7 d 内使用;

甲醛: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 10%的福尔马林溶液,用于固定组织。

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

供试品的配制:准确称取牛蒡子粉 3.75、7.5、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,浓度分别为 0.075、0.15、0.3 g/mL,对应的剂量分别为 1.5、3、6 g/kg.bw,现配现用,灌胃前充分摇匀。

1.3 试验动物 SPF 级 Wistar 大鼠,80 只,雌雄各半,4~6 周龄,体重 80~100 g,差异不超过平均体重的 20%。大鼠由华中科技大学实验动物中心提供,

实验动物生产许可证号:SCXK(鄂)2010-0009。大鼠购买后在实验室动物房内预饲养一周,饲喂不含任何药物的全价营养颗粒饲料。实验动物使用许可证号:SYXK(鄂)2014-0081。实验动物的饲养与管理严格按照《实验动物饲养与使用原则》的要求进行,整个试验过程中保持室内清洁卫生,空气流通。

2 方法

2.1 动物分组 将 80 只 Wistar 大鼠随机分为 4 组,即空白对照组和牛蒡子粉低、中、高三个剂量组,每组 20 只,雌雄各半。大鼠每笼 2 只,雌雄分开,饲养在不锈钢笼中,自由饮水和采食。室温控制在 20~25 ℃,相对湿度 40%~70%,照明采用人工昼夜,12 h 照明(早 7 点~晚 7 点),12 h 黑暗(晚 7 点~早 7 点),每日更换新鲜自来水,每周更换 2 次垫料。

2.2 剂量设计 根据《兽药研究技术指导原则》,对于求不出 LD₅₀且靶动物可能摄入量较大,剂量设计无法达到靶动物可能摄入量 100 倍的药物,高剂量组可以按最大耐受量设计。基于此,由于牛蒡子粉最大溶解浓度及大鼠灌胃体积的限制,将高剂量组设计为 6 g/kg.bw(牛蒡子粉的最大可溶解浓度 0.3 g/mL,大鼠灌胃体积 2 mL/100g.bw)。根据低剂量组应高于药效学有效剂量,结合《中华人民共和国兽药典》和药效学资料,设计低剂量组剂量为 1.5 g/kg.bw。在高、低剂量组之间按剂量比设计中剂量组剂量为 3 g/kg.bw。

2.3 给药方法及时间 灌胃给药,各剂量组采取等体积不等浓度的给药方式,给药过程中始终进行搅拌以保证药液均匀。对照组给予等体积的 0.5%羧甲基纤维素钠。每周给药 7 d,每天给药 1 次,每周根据体重变化调整 1 次给药量,给药期限为 30 d。

2.4 观察指标

2.4.1 一般临床症状 每天观察各组大鼠的一般生理指标,主要包括外观体征和行为活动,如精神状态、采食量和饮水量、体重变化、粪便颜色与性状、腺体分泌、呼吸状况、中毒症状和死亡情况等。

如果发现异常,如过度兴奋、躁动、惊跳、肌肉麻痹或震颤、精神萎靡、蜷缩不动、步态异常、皮毛污秽或死亡等情况,均应进行详细记录并处理。若在试验过程中发现濒死或死亡大鼠,详细记录大鼠死亡前的异常表现及死亡时间,并分析死亡原因是否为药物引起^[6-7]。

2.4.2 体重和进食量 每周日记录大鼠体重,并根据体重调整大鼠给药量,每周一开始按调整后的剂量给药。

每周日称量动物的给料量和剩余量,计算动物的进食量及饲料利用率。在实验过程中,除每周日外,其余时间若发现饲料不够,可随时添加饲料,并如实记录。

2.4.3 血液学检查 试验结束时进行血液学检查。采血前对各剂量组大鼠禁食 16 h,3%戊巴比妥钠溶液(80 mg/kg.bw)麻醉,腹主动脉采血 2 mL。采集的血样于血细胞分析仪上检测红细胞(RBC)、白细胞(WBC)、血红蛋白(HGB)、血小板(PLT)、淋巴细胞(LY)、单核细胞(MO)等血液学指标^[8]。

2.4.4 血液生化检查 试验结束时测定血液生化指标。3%戊巴比妥钠溶液(80 mg/kg.bw)麻醉,腹主动脉采血 2 mL,将采集血液呈 45~60 度角于 4℃冰箱放置 1 h,3000 r/min 离心 5 min 分离血清,于生化自动分析仪上测定血清中的谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、血清白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、血糖(Glu)、总胆固醇(TCH)和甘油三酯(TG)等指标^[9]。

2.4.5 脏器重量和脏/体比值 采血后处死动物,解剖,肉眼观察每只动物心、肝、脾、肺、肾、胃肠等胸腔腹腔内器官有无颜色改变以及渗出、水肿、增生、萎缩等病变,做好记录。用眼科镊和眼科剪分离心、肝、脾、肺、肾、胃肠、睾丸(雄性)子宫(雌性)、卵巢(雌性)等脏器,清除干净各脏器周围结缔组织和脂肪组织,用电子天平逐一称重(胃肠除外),计算脏/体比值,再用 10%福尔马林溶液立即固定^[10]。

2.4.6 病理组织学检查 病理切片检查:若大体解剖肉眼未见异常,选取高剂量组和阴性对照组作病

理切片。选取高剂量组和阴性对照组各 20 只动物(雌雄各半)的部分脏器(肝脏、脾脏、肾脏、胃肠、卵巢和睾丸),取材后,常规脱水、透明、浸蜡、制片及 HE 染色,在光学显微镜下由低倍至高倍观察各组织的形态学变化,并详细记录描述所观察到的形态学变化^[11]。

病理结果评价标准:与阴性对照组比较,以镜下形态学变化进行描述判断。

病理组织学观察:依各脏器形态学结构各异,但主要是以细胞变性作为观察指标,并根据病理改变程度“-”、“+”、“++”、“+++”量化,本试验所获数据采用非参数统计法(Nonparametric statistic)进行病理改变的评价。细胞变性及细胞坏死评价分级如表 1、表 2 所示。

表 1 细胞变性评价表

量化标准	病理评价程度	分值
+	散在的单个细胞水肿、脂滴及胞浆状物和灶状炎性细胞浸润(包括肾小球大小不一,胃肠粘膜上皮变性)	1 分
++	灶状细胞水肿,脂滴或形成透明状空泡(3-5 个细胞形成灶状和肾小球大小不一超过 3-5 个)	2 分
+++	数个细胞相溶成片状空泡和边缘光滑的脂滴,肾小球囊内可见明显炎性细胞浸润或肾小球大小不一明显,胃肠粘膜各层可见多个炎性细胞浸润灶等病理改变	3 分

表 2 细胞坏死评价表

病理评价程度	分值
散在个别细胞占整个视野的 1/4	2 分
坏死细胞占整个视野的 1/2	4 分
坏死细胞占整个视野的 3/4	6 分
坏死细胞弥漫存在占整个视野	8 分

2.5 统计分析 实验数据采用 Microsoft Excel 软件建立数据库,对大鼠的体重、采食量、各项血液学指标及脏/体比值进行统计处理,并列表说明。各

项数据以“平均数±标准差”表示,计量资料采用方差检验,计数资料采用非参数检验,并按动物性别分别统计。

3 结果与分析

3.1 一般观察 试验期间每天观察大鼠的行为活动,各剂量组大鼠均无死亡现象,精神状态良好,活动正常,未出现过兴奋、躁动、精神萎靡、步态异常或腺体分泌异常等现象,被毛整洁有光泽,无脱毛现象,粪便颜色、硬度均正常。

3.2 对大鼠体重、进食量及饲料利用率的影响 在试验观察期内,高剂量组的每周体重及进食量与中、低剂量组及空白对照组相差异不显著($P>0.05$)。各剂量组雌鼠与雄鼠饲料利用率随着时间的增长而逐渐降低,开始阶段雌鼠与雄鼠体重相差不大,饲料利用率比较接近,后来由于雄鼠进食量大、体重增长快,饲料利用率高于雌鼠,但雌雄各剂量组大鼠饲料利用率与空白对照组相比差异不显著($P>0.05$),见表 3、表 4、表 5。

表 3 牛蒡子粉对大鼠体重的影响($\bar{x}\pm S.D$)

Tab 3 The impact of arctii fructus powder on body weight of rats($\bar{x}\pm S.D$)

性别	剂量/(g/kg.bw)	动物数/只	体重/g				
			第 0 周	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
雌	0	10	92.33±10.63	134.72±14.88	161.37±16.03	187.36±13.31	206.10±17.01
	1.5	10	92.92±3.44	137.67±5.31	168.85±10.23	192.45±12.19	210.80±14.86
	3	10	102.04±9.23	146.80±7.56	168.41±10.39	193.22±16.03	212.74±12.99
	6	10	92.33±3.86	131.29±2.63	156.58±2.82	183.45±1.25	200.83±1.14
雄	0	10	96.68±9.81	157.71±7.87	208.48±6.34	270.30±9.69	319.35±8.29
	1.5	10	100.98±8.33	163.90±7.56	213.65±8.49	273.06±4.25	324.22±4.59
	3	10	93.93±1.91	155.33±12.84	201.84±14.14	259.53±11.39	307.37±7.70
	6	10	94.97±5.17	146.83±7.76	198.5±10.43	259.43±8.84	308.53±7.13

各剂量组与空白对照组比较, $P>0.05$

each dose group compared with the control group, $P>0.05$

表 4 牛蒡子粉对大鼠进食量的影响($\bar{x}\pm S.D$)

Tab 4 The impact of arctii fructus powder on intake of rats($\bar{x}\pm S.D$)

性别	剂量/(g/kg.bw)	动物数/只	进食量/g			
			第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
雌	0	10	100.75±11.24	108.89±7.72	119.18±3.29	129.80±7.60
	1.5	10	94.22±9.04	116.36±15.70	118.15±2.34	122.49±5.49
	3	10	103.64±1.83	106.73±10.63	116.37±11.89	122.90±11.16
	6	10	88.87±6.93	95.92±9.71	117.75±8.27	120.41±10.69
雄	0	10	116.11±5.42	151.88±12.11	182.12±4.19	192.78±8.67
	1.5	10	118.08±3.32	146.23±3.80	180.58±12.31	195.06±8.81
	3	10	109.77±8.67	129.79±18.35	174.41±7.81	190.39±2.81
	6	10	104.21±7.69	138.34±7.78	186.99±7.32	197.99±11.94

各剂量组与空白对照组比较, $P>0.05$

each dose group compared with the control group, $P>0.05$

表 5 牛蒡子粉对大鼠饲料利用率的影响($\bar{x}\pm S.D$)Tab 5 The impact of arctii fructus powder on food utilization of rats($\bar{x}\pm S.D$)

性别	剂量/(g/kg.bw)	动物数/只	饲料利用率/%			
			第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
雌	0	10	42.43±7.30	24.51±0.86	21.77±2.32	14.35±2.18
	1.5	10	47.34±2.50	26.75±0.64	19.95±3.07	14.38±1.82
	3	10	43.22±5.17	20.07±2.69	21.13±4.36	16.11±3.87
	6	10	43.97±5.21	26.53±4.18	22.77±1.77	14.56±2.15
雄	0	10	52.59±1.63	33.47±0.80	33.88±4.27	25.45±0.73
	1.5	10	53.33±2.40	34.05±1.51	32.74±3.61	26.26±1.27
	3	10	55.65±7.47	36.29±6.55	33.08±0.37	25.12±2.40
	6	10	51.72±5.11	36.00±5.16	32.58±2.14	24.86±1.99

各剂量组与空白对照组比较, $P>0.05$

each dose group compared with the control group, $P>0.05$

3.3 对大鼠增重、总进食量、总饲料利用率的影响
在试验观察期内,中、高剂量组大鼠体重总增重与总进食量略低于低剂量组与空白对照组,但差异不

显著($P>0.05$)。雌、雄大鼠各剂量组总饲料利用率与空白对照组比较差异不显著($P>0.05$),见表 6。

表 6 牛蒡子粉对大鼠增重与总饲料利用率的影响($\bar{x}\pm S.D$)Tab 6 The impact of arctii fructus powder on weight gain and feed utilization rate of rats($\bar{x}\pm S.D$)

性别	剂量/(g/kg.bw)	动物数/只	体重增重/g	总进食量/g	总饲料利用率/%
雌	0	10	113.77±7.38	458.62±23.05	24.83±1.72
	1.5	10	117.88±14.32	451.22±31.42	26.07±1.45
	3	10	110.70±13.92	449.65±33.16	24.57±1.81
	6	10	108.50±4.12	442.95±10.72	25.67±1.39
雄	0	10	222.66±13.84	642.88±26.88	34.62±0.99
	1.5	10	223.24±11.64	639.95±15.57	34.88±1.56
	3	10	213.43±6.74	604.36±20.62	35.32±0.28
	6	10	213.56±6.23	627.65±28.18	34.05±1.07

各剂量组与空白对照组比较, $P>0.05$

each dose group compared with the control group, $P>0.05$

3.4 血液学检查结果 在试验结束时对各剂量组大鼠进行血液学检查,检查结果表明雌、雄大鼠各剂量组血常规、血生化各项指标与空白对照组相比差异均不显著($P>0.05$),且均在正常值范围之内,见表 7、表 8、表 9。

3.5 对大鼠脏器重量与脏/体比值的影响 试验结束时对大鼠各主要脏器进行称重并计算脏/体比值,结果表明雌、雄大鼠高、中、低剂量组与空白对照组比较脏器重量、脏/体比值差异均不显著($P>0.05$),且均在正常值范围之内,见表 10。

表 7 牛蒡子粉对大鼠血常规检查结果的影响 ($\bar{x}\pm S.D$)

Tab 7 The impact of arctii fructus powder on blood routine examination results of rats ($\bar{x}\pm S.D$)

性别	剂量/(g/kg.bw)	动物数/只	WBC/($\times 10^9/L$)	RBC/($\times 10^{12}/L$)	HGB/(g · L ⁻¹)	PLT/($\times 10^9/L$)	RET/%
雌	0	10	6.39±1.79	6.68±0.58	142.25±6.18	1013.5±79.01	2.32±0.34
	1.5	10	5.82±2.92	6.81±0.38	142.60±5.08	1052.4±88.12	2.17±0.35
	3	10	5.04±1.11	6.88±0.31	145.40±3.58	1028.2±55.62	2.21±0.39
	6	10	5.13±1.30	6.99±0.24	144.20±6.58	1049.6±283.04	2.38±0.30
雄	0	10	5.64±2.35	6.63±0.80	140.80±8.58	1134.4±92.27	3.22±0.78
	1.5	10	6.25±1.30	6.83±0.22	144.20±6.83	1117.6±166.79	3.18±0.41
	3	10	7.01±2.88	6.58±0.46	142.60±7.16	1159.4±45.03	2.94±0.88
	6	10	7.01±3.12	6.55±0.55	140.40±7.44	1001.0±71.80	3.18±0.30

各剂量组与空白对照组比较, $P>0.05$

each dose group compared with the control group, $P>0.05$

表 8 牛蒡子粉对大鼠白细胞分类的影响 ($\bar{x}\pm S.D$)

Tab 8 The impact of arctii fructus powder on classification of leukocytes in rat ($\bar{x}\pm S.D$)

性别	剂量/(g/kg.bw)	动物数/只	LY/%	MO/%	(E+N+B)/%
雌	0	10	72.58±5.70	2.08±0.46	25.35±5.39
	1.5	10	74.60±8.90	2.52±1.12	22.88±7.94
	3	10	74.04±7.01	2.46±0.61	23.50±6.78
	6	10	73.66±4.68	2.54±0.90	23.80±4.50
雄	0	10	76.24±4.15	2.24±0.53	21.52±4.41
	1.5	10	74.44±7.36	2.62±0.93	22.94±7.20
	3	10	76.76±3.92	2.16±0.55	21.08±4.34
	6	10	71.18±6.92	1.98±0.56	26.84±6.97

各剂量组与空白对照组比较, $P>0.05$

each dose group compared with the control group, $P>0.05$

表 9 牛蒡子粉对大鼠血液生化的影响 ($\bar{x}\pm S.D$)

Tab 9 The impact of arctii fructus powder on blood biochemistry of rats ($\bar{x}\pm S.D$)

性别	剂量/(g/kg.bw)	动物数/只	Glu/(mmol · L ⁻¹)	BUN/(mmol · L ⁻¹)	Cr/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	TCH/(mmol · L ⁻¹)	TCG/(mmol · L ⁻¹)
雌	0	10	3.81±0.70	6.59±0.43	29.75±3.69	2.18±0.42	0.37±0.05
	1.5	10	3.00±0.50	6.05±0.54	31.20±5.12	1.95±0.23	0.49±0.19
	3	10	3.88±0.62	6.47±0.99	30.40±5.59	1.94±0.33	0.53±0.12
	6	10	3.98±1.69	6.03±1.20	29.60±5.32	2.05±0.41	0.42±0.16
雄	0	10	3.50±0.42	5.62±1.16	30.80±5.07	1.92±0.39	0.59±0.13
	1.5	10	3.64±0.86	5.13±0.39	31.60±5.73	1.77±0.30	0.63±0.23
	3	10	4.31±1.19	6.52±1.25	31.80±3.70	1.85±0.41	0.66±0.17
	6	10	3.46±0.72	5.06±1.09	32.20±6.06	1.82±0.34	0.51±0.16

各剂量组与空白对照组比较, $P>0.05$

each dose group compared with the control group, $P>0.05$

续表 9 牛蒡子粉对大鼠血液生化的影响($\bar{x}\pm S.D$)Tab 9 The impact of arctii fructus powder on blood biochemistry of rats($\bar{x}\pm S.D$)

性别	剂量/(g/kg.bw)	动物数/只	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	TP/(g·L ⁻¹)	ALB/(g·L ⁻¹)	ALB/GIO
雌	0	10	27.45±8.00	88.25±15.62	51.73±1.71	29.95±0.87	1.38±0.06
	1.5	10	37.08±8.31	101.06±8.03	54.38±2.23	30.50±1.84	1.28±0.12
	3	10	27.54±3.22	92.15±11.14	52.76±2.00	30.12±0.99	1.33±0.03
	6	10	33.48±11.18	100.89±12.27	54.72±2.99	30.62±1.47	1.28±0.14
雄	0	10	32.04±7.55	106.21±11.29	51.12±1.80	30.12±0.79	1.44±0.06
	1.5	10	37.98±7.35	117.42±22.42	53.94±1.65	30.70±0.43	1.32±0.10
	3	10	38.34±3.58	104.12±14.18	51.02±2.90	29.42±0.90	1.37±0.10
	6	10	38.70±8.89	105.45±16.63	50.98±1.44	29.00±0.96	1.32±0.07

各剂量组与空白对照组比较, $P>0.05$ each dose group compared with the control group, $P>0.05$ 表 10 牛蒡子粉对大鼠脏器重量和脏/体比值的影响($\bar{x}\pm S.D$)Tab 10 The impact of arctii fructus powder on organ weight and organ/body ratio of rats($\bar{x}\pm S.D$)

性别	剂量/(g/kg.bw)	动物数/只	剖杀时体重/g	心脏		肝脏	
				重量/g	脏/体比值/%	重量/g	脏/体比值/%
雌	0	10	187.53±16.33	0.83±0.08	0.44±0.03	6.12±0.71	3.30±0.17
	1.5	10	192.98±16.01	0.82±0.13	0.42±0.03	6.50±0.90	3.36±0.19
	3	10	192.66±10.13	0.81±0.18	0.42±0.07	6.46±0.80	3.35±2.44
	6	10	182.41±4.26	0.80±0.05	0.44±0.02	6.38±1.15	3.50±0.07
雄	0	10	292.92±7.20	1.15±0.13	0.40±0.04	9.32±0.83	3.18±0.23
	1.5	10	290.67±4.74	1.12±0.10	0.39±0.03	9.48±0.10	3.26±0.09
	3	10	286.05±4.02	1.08±0.08	0.38±0.02	9.25±0.32	3.23±0.07
	6	10	287.04±10.40	1.14±0.13	0.40±0.03	9.08±0.77	3.16±0.15

各剂量组与空白对照组比较, $P>0.05$ each dose group compared with the control group, $P>0.05$ 续表 10 牛蒡子粉对大鼠脏器重量和脏/体比值的影响($\bar{x}\pm S.D$)Tab 10 The impact of arctii fructus powder on organ weight and organ/body ratio of rats($\bar{x}\pm S.D$)

性别	剂量/(g/kg.bw)	动物数/只	脾脏		肺脏	
			重量/g	脏/体比值/%	重量/g	脏/体比值/%
雌	0	10	0.44±0.08	0.24±0.04	1.02±0.14	0.54±0.06
	1.5	10	0.46±0.04	0.24±0.04	1.08±0.13	0.56±0.03
	3	10	0.45±0.04	0.23±0.01	1.11±0.09	0.58±0.04
	6	10	0.48±0.02	0.26±0.01	1.05±0.07	0.57±0.03
雄	0	10	0.67±0.07	0.23±0.02	1.47±0.05	0.50±0.01
	1.5	10	0.64±0.08	0.22±0.03	1.50±0.03	0.52±0.01
	3	10	0.67±0.05	0.23±0.02	1.43±0.06	0.50±0.02
	6	10	0.69±0.03	0.24±0.01	1.49±0.12	0.52±0.05

各剂量组与空白对照组比较, $P>0.05$ each dose group compared with the control group, $P>0.05$

续表 10 牛蒡子粉对大鼠脏器重量和脏/体比值的影响 ($\bar{x}\pm S.D$)

Tab 10 The impact of arctii fructus powder on organ weight and organ/body ratio of rats

性别	剂量/(g/kg.bw)	动物数/只	肾脏		子宫(雌)/睾丸(雄)		卵巢(雌)	
			重量/g	脏/体比值/%	重量/g	脏/体比值/%	重量/g	脏/体比值/%
雌	0	10	1.73±0.22	0.92±0.04	0.47±0.11	0.25±0.04	0.164±0.037	0.087±0.013
	1.5	10	1.70±0.24	0.88±0.14	0.45±0.08	0.23±0.02	0.174±0.059	0.089±0.023
	3	10	1.75±0.27	0.90±0.09	0.47±0.04	0.25±0.03	0.160±0.033	0.083±0.014
	6	10	1.66±0.09	0.91±0.05	0.43±0.10	0.24±0.06	0.163±0.044	0.089±0.022
雄	0	10	2.53±0.23	0.86±0.06	2.86±0.08	0.98±0.02	--	--
	1.5	10	2.56±0.16	0.88±0.05	2.99±0.11	1.03±0.06	--	--
	3	10	2.55±0.43	0.89±0.14	2.95±0.11	1.03±0.03	--	--
	6	10	2.54±0.05	0.88±0.13	2.96±0.03	1.03±0.05	--	--

各剂量组与空白对照组比较, $P>0.05$

each dose group compared with the control group, $P>0.05$

3.6 病理组织检查 试验结束时对大鼠进行大体解剖, 肉眼观察各剂量组及空白对照组大鼠的心、肝、脾、肺、肾及胃肠等胸腹腔主要脏器有无病变,

发现各脏器的大小、形态及外观颜色均正常, 无充血、淤血现象, 脏器表面无出血点及坏死灶, 亦无明显萎缩、增生、渗出、水肿及溃烂等病变(图 1)。



图 1 部分大体解剖图片

Fig 1 Partial gross anatomy

大体解剖未见肉眼可见病变, 故对高剂量组及对照组大鼠做组织切片进行镜下观察, 每组 20 只, 雌雄各半。若高剂量组组织切片可见明显病变, 再对中、低剂量组进行组织切片观察。

镜下所见: 见表 11-表 14, 图 2-图 5。

组织切片观察没有发现明显中毒性病理变化。部分大鼠肝脏切片可见肝细胞轻微脂肪变性、点状坏死及肝窦内炎性细胞浸润, 个别肝脏出现肝细胞凝固性坏死; 部分大鼠存在肾小球系膜增生, 间质内少量炎性细胞浸润; 个别大鼠脾脏存在炎性细胞浸润; 胃肠、卵巢、睾丸等均未出现病变。

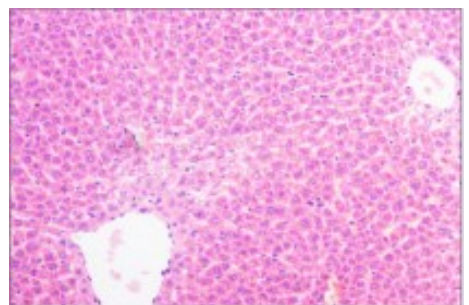


图 2 (♂高 7): 肝细胞轻度脂肪变性

Fig 2 (♂ High 7) liver cells have slight steatosis

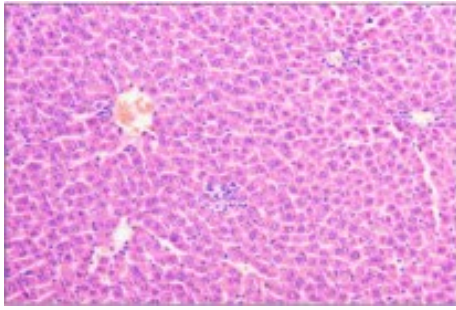


图 3 (♀高 6): 肝细胞点状坏死, 炎性细胞浸润
Fig 3 (♂ High 6) Note the spotty necrosis of hepatocytes with inflammatory cell infiltration

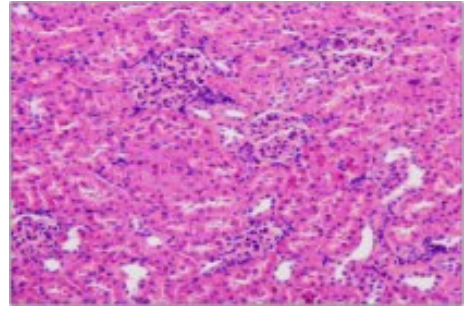


图 5 (♀高 6): 肾小球系膜增生, 少量炎性细胞浸润
Fig 5 (♀ High 6) Glomerular mesangial hyperplasia with a small amount of inflammatory cell infiltration

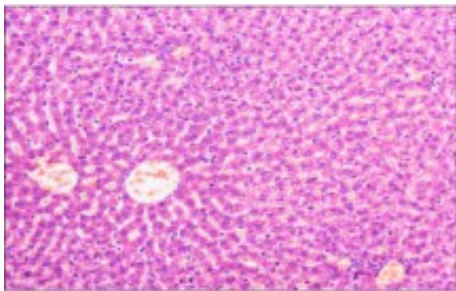


图 4 (♀高 3): 肝细胞脂肪变性, 肝窦扩张

Fig 4 (♂ High 3) Hepatocyte steatosis and hepatic sinus dilation

4 讨论与结论

4.1 剂量设计 本试验采用 SPF 级 Wister 大鼠进行牛蒡子粉经口给药 30 d 长期毒性研究, 以 2 mL/100 g.bw 等体积不等浓度灌胃给药, 每天 1 次, 连续 30 d。由于药物急性毒性试验无法求出 LD₅₀, 以及药物最大溶解度的限制, 高剂量组无法达到靶动物可能摄入量的 100 倍, 根据《兽药研究技术指导原则》, 高剂量组以最大耐受量设计, 故将高剂量组设

表 11 牛蒡子粉对大鼠肝脏病理组织学检查结果 (n=10)

Tab 11 The impact of arctii fructus powder on liver histopathological examination results

性别	剂量 (g/kg.bw)	细胞变性(例)					细胞坏死或肉芽肿(例)			其他
		浊肿	空泡样变	脂肪变性	炎性细胞 浸润	嗜酸性变	散在点状 坏死	凝固性 坏死	肉芽肿	
雌	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0
	6	0	0	1	1	0	1	0	0	1
雄	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
	6	0	0	2	1	0	1	0	0	0

表 12 牛蒡子粉对大鼠肾脏病理组织学检查结果 (n=10)

Tab 12 The impact of arctii fructus powder on kidney histopathological examination results

性别	剂量 (g/kg.bw)	皮质(例)					髓质和肾盂(例)		
		肾小管上皮细胞			间质		上皮细胞 浊肿	炎性浸润	坏死
		浊肿	水样变性	脂肪变性	肾小球病变	炎性细胞浸润			
雌	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0
雄	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	2	2	0	0	0

表 13 牛蒡子粉对大鼠脾脏病理组织学检查结果 (n=10)

Tab 13 The impact of arctii fructus powder on spleen histopathological examination results

性别	剂量/(g/kg.bw)	马氏小体 萎缩(例)	血窦扩张淤血 包膜水肿(例)	炎性细胞 浸润(例)	生发中心 变大(例)	坏死或肉芽肿(例)
雌	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0
雄	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	1	0	0

表 14 牛蒡子粉对大鼠各脏器病理组织学检查积分表

Tab 14 The impact of arctii fructus powder on integral histopathological examination results

性别	剂量/(g/kg.bw)	动物数/只	肝脏	肾脏	脾脏	胃、肠	睾丸	卵巢	总积分
雌	0	10	6	1	0	0	0	0	7
	6	10	5	0	0	0	0	0	5
雄	0	10	5	0	0	0	0	0	5
	6	10	5	4	1	0	0	0	10

计为 6 g/kg.bw(牛蒡子粉的最大浓度 0.3 g/mL,大鼠灌胃体积 2 mL/100g.bw),低剂量组应高于药效学有效剂量,结合兽药典及药效学资料,将低剂量组灌胃剂量设计为 1.5 g/kg.bw,在高、低剂量组之间按剂量比设计中剂量组为 3 g/kg.bw(兽药研究技术指导原则汇编 2012)。

4.2 对体重和进食量的影响 试验期间各剂量组大鼠的采食、饮水、活动均正常,未出现异常症状和死亡现象,进食量和体重均正常增长,雄鼠体重增长速度明显高于雌鼠,符合大鼠生长规律。中、高剂量组大鼠体重总增重与总进食量略低于低剂量组与空白对照组,可能是由于药物浓度过高,制成的混悬液过于黏稠,不容易消化,给胃造成机械负担导致吸收障碍,从而影响大鼠进食与增重,但与对照组相比差异不显著($P>0.05$)。结合体重与进食量计算出大鼠饲料利用率,给药组与对照组相比差异也不显著($P>0.05$),说明牛蒡子粉对消化系统影响不大,不会对大鼠的正常生长产生影响。

4.3 对血常规的影响 血常规检验有助于在早期对全身性疾病进行诊断,主要包括红细胞、血红蛋白、网织红细胞、白细胞、血小板及白细胞分类等项

目。在研究牛蒡子粉的毒性时对血常规进行检测有助于对药物进行毒理学评价^[12]。在本试验对大鼠进行血常规的检测结果中,给药组与空白组各项指标值相比差异均不显著($P>0.05$),且数值均在大鼠正常生理值范围内,说明牛蒡子粉对大鼠血液学指标无影响。

4.4 对血液生化指标的影响 本试验主要对大鼠肝功能、肾功能、血糖、血脂等指标进行了检测。肝功能检测的指标包括血浆总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、白蛋白/球蛋白(ALB/GIO)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)与天冬氨酸氨基转移酶(AST)。血浆中白蛋白和大部分球蛋白是由肝脏合成的,二者的浓度变化可以反映肝功能状况^[13]。动物肝脏含有多种酶,当肝脏受损时,会导致血清中酶含量发生改变,临床中通过对血清中 ALT 和 AST 的检测判断肝功能^[14]。肾功能检测的指标包括肌酐(Cr)和尿素氮(BUN)^[15]。在本试验对大鼠的肝、肾功能及血糖血脂的检测结果中,给药组与空白组相比各项指标均无显著性差异($P>0.05$),且均在正常生理值范围内,说明牛蒡子粉对大鼠的血液生化指标无影响。

4.5 对主要脏器的影响 本试验对大鼠进行大体解剖,仔细观察给药组与对照组大鼠主要脏器的大小、颜色、质地,未发现萎缩、肿胀、充血、淤血、坏死等异常变化,对心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、子宫、睾丸、卵巢等进行称重,并计算脏/体比值,给药组与空白组比较无显著性差异,说明牛蒡子粉对大鼠脏器大体方面无影响。大体解剖未见肉眼可见病变,对高剂量组与空白组部分脏器进行病理组织学检查,分别对肝、肾、脾、胃肠、睾丸、卵巢等脏器进行 HE 染色及镜下观察,发现高剂量组与空白组均有个别大鼠存在部分脏器的轻微病变,但零星分布无规律性,两组比较差异不显著,说明牛蒡子粉对大鼠脏器无病理损害作用。

4.6 结论 牛蒡子粉 30 d 长期毒性试验结果表明:对 SPF 级 Wister 大鼠以 1.5、3 及 6 g/kg.bw 的剂量灌胃给予牛蒡子粉,连续给药 30 d,各剂量组均无明显中毒反应及死亡情况;实验组体增重、进食量及饲料利用率与空白组相比差异不显著 ($P>0.05$);实验组血常规及血液生化指标、主要脏器脏/体比值与空白组比较差异均不显著 ($P>0.05$);对高剂量组与空白对照组进行组织病理学检查,两组均有个别大鼠部分脏器出现轻微病变,且零星散在分布,无规律性,各组之间差异不显著,故认为与药物无关。综上所述,未发现牛蒡子粉有明显毒性作用。

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 (two editions of 2015) [S].
- [2] 边巴次仁, 尼玛仓决, 赤列旺久, 等. 中草药牛蒡子化学成分及药理研究进展 [J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(9): 67-74. Bian B C R, Ni M C J, Chi L W J, *et al.* Research progress on chemical composition and pharmacology on Chinese herbal medicine *fructus arctii* [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018, 52(9): 67-74.
- [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 [J]. 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 type2 [J]. Research in Veterinary Science. 2016, 6(106): 159-164.
- [5] 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].
- [6] Awale S, Lu J, Kalauni S K, *et al.* Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation [J]. Cancer Res, 2006, 66(3): 1751-1757.
- [7] 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 [J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4(10): 1419-1429.
- [8] Chul Y K, Mi-Jeong Ahn, Jinwoong Kim. A preparative isolation and purification of arctigenin and matairesinol from *Forsythia ko-reana* by centrifugal partition chromatography [J]. J. Sep. Science. 2006, 29, 656-659.
- [9] Dos Santos AC, Baggio CH, Freitas CS, *et al.* Gastroprotective activity of the chloroform extract of the roots from *Arctium Lappa L.* [J]. J Pharm Pharmacol. 2008, 60(6): 795-801.
- [10] Ishihara K, Yamagishi N, Saito Y, *et al.* Arctigenin from *Fructus Arctii* is a novel suppressor of heat shock response in mammalian cells [J]. Cell Stress Chaperones, 2006, 11(2): 154-161.
- [11] Kang HS, Lee J Y, Kim C J, *et al.* Anti-inflammatory activity of arctigenin from *Forsythiae Fructus* [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2008, 116, 305-312.
- [12] Kang K, Lee H J, Kim C Y, *et al.* The chemopreventive effects of *Saussurea salicifolia* through induction of apoptosis and phase II detoxification enzyme [J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30 (12): 2352-2359.
- [13] Shi R, Zhou H, Liu Z, *et al.* Influence of *coptis Chinensis* on pharmacokinetics of flavonoids after oral administration of *radix Scutellariae* in rats [J]. Biopharm drug dispos, 2009, 30(7): 398-410.
- [14] Wu J G, Wu J Z, Sun L N, *et al.* Ameliorative effects of arctiin from *Arctium lappa* on experimental glomerulonephritis in rats [J]. Phytomedicine, 2009, 16(11): 1033-1041.
- [15] Zhao F, Wang L, Liu K. *In vitro* anti-inflammatory effects of arctigenin, a lignan from *Arctium lappa L.*, through inhibition on iNOS pathway [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 122(3): 457-462.