



吴茱萸多基原、多产地毒性效应特征研究

李莉¹, 赵军宁^{1*}, 易进海¹, 舒光明¹, 李波²

(1. 四川省中医药科学院, 国家中医药管理局中药质量生物学评价重点实验室, 四川地道药材系统开发工程技术研究中心, 中药品质评价与创新中药研究四川省重点实验室, 四川 成都 610041;
2. 泸州医学院, 四川 泸州 646000)

[摘要] 目的: 研究有毒中药吴茱萸多基原、多产地的毒性特征变化。方法: 采用小鼠急性毒性和亚急性毒性试验方法, 分别给小鼠灌胃吴茱萸、疏毛吴茱萸、石虎等 9 个不同产地样品水提取物 1 次或者连续 15 d, 测定其对小鼠的最大耐受量 (MTD) 或单次最大给药量, 同时观察毒性症状; 亚急性毒性试验测定各组动物血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG) 生化指标, 计算肝脏系数, 并观察肝脏组织病理变化。结果: 小鼠急性毒性试验中吴茱萸 3 个产地样品 MTD 分别为生药 62, 44.8, 35.8 g · kg⁻¹; 疏毛吴茱萸 3 个产地样品 MTD 分别为生药 56, 44.8, 35.8 g · kg⁻¹; 石虎 3 个产地样品最大给药量分别为生药 60, 54, 45 g · kg⁻¹。9 个样品的毒性症状基本一致, 主要表现为怠动, 小鼠扭体运动, 呼吸急促等。吴茱萸亚急性毒性试验中, 给药组小鼠 ALT 均有不同程度升高, 小鼠肝脏指数均明显升高, 肝脏病理显示给药组部分动物肝细胞浆疏松, 可伴中央静脉和 (或) 小叶下静脉充血。结论: 连续或单次给小鼠灌胃吴茱萸水提取物后对小鼠均有一定的毒性, 肝脏为其毒性靶器官之一; 吴茱萸相对毒性大小与产地关系密切, 而与基原似无明显相关性。

[关键词] 吴茱萸; 基原; 产地; 毒性

吴茱萸为芸香料植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss) Benth, 石虎 *E. rutaecarpa* (JuSs) Benth var *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss) Benth. var *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实, 具有散寒止痛, 降逆止呕, 助阳止泻的功效, 用于厥阴头痛、寒疝腹痛、寒湿脚气、经行腹痛、脘腹胀痛、呕吐吞酸、五更泄泻^[1]。吴茱萸是典型的多基原、多道地性“有毒中药”^[2]。理论上推测, 不同基原的同一种药材, 或者同基原而产地不同的药材, 其有效/有毒成分、类别可能存在一定差异, 有可能出现生物活性及毒性不同。为探讨有毒中药基原、产地与毒性相关性, 作者以多基原有毒中药吴茱萸 (吴茱萸、石虎、疏毛吴茱萸) 临床常用水提取物形式为代表, 研究吴茱萸基原产地的毒性特征及相关性, 同时希望为吴茱萸药材质量评价提供参考。

1 材料

1.1 试验药材

I 吴茱萸 (重庆红庙村), II 吴茱萸 (重庆合

川), III 吴茱萸 (贵州遵义), IV 石虎 (贵州松桃), V 石虎 (湖南黄雷), VI 石虎 (湖南凉伞), VII 疏毛吴茱萸 (贵州玉屏), VIII 疏毛吴茱萸 (贵州印江), IX 疏毛吴茱萸 (贵州松桃) 共 3 个基原 9 个产地, 由四川省中医药科学院资源与种植研究所舒光明研究员实地采集并鉴定。以上 I ~ IX 号药材各取 1 kg, 加水煎煮 2 次, 每次加水 10 倍, 第 1 次煎煮 2 h, 第 2 次煎煮 1.5 h, 滤过, 浓缩。依次得 405, 499, 426, 489, 701, 679, 590, 587, 695 g 浓稠药膏, 每克药膏含原生药 2.47, 2.00, 2.35, 2.04, 1.43, 1.47, 1.69, 1.70, 1.44 g, -20 °C 冰箱保存。

1.2 动物

KM 小鼠, SPF 级, 雌雄各半, 体重 18 ~ 22 g, 由四川省中医药科学院实验动物中心提供, 许可证号 SCXK(川)2008-0019。

1.3 仪器试剂

全自动生化测试仪 (7020 型日立, 日本产)。BMJ-III 型包埋机及病理组织包埋冷冻台 (常州市中威电子仪器有限公司); LEICA RM2135 切片机, PHY-III 型病理组织漂烘仪 (Leica Microsystems, Germany); XYTX-2000 新药图像彩色定量分析系统。PB302 型电子天平。AST (批号 0111011), ALT (批号 0211021), TC (批号 0211011), TG (批号

[稿件编号] 20120507007

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (2009CB522801); 国家自然科学基金面上项目 (81073047)

[通信作者] * 赵军宁, Tel: (028) 85226120, E-mail: zarmy@189.cn



0311021)均由四川省迈克科技有限责任公司提供。

2 方法

2.1 小鼠急性毒性试验

参照急性毒性(半数致死量 LD_{50} 、最大耐受量 MTD)试验方法^[3],进行吴茱萸 3 个基原 9 个产地共计 9 个样品水提物急性毒性试验比较研究。预实验分别找出各样品 LD_{100} 、 LD_0 。正式急性毒性试验,取小鼠,雌雄各半,随机分组,设 9 个样品组和正常对照组,每组 20 只。药物组按 $40 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重每日灌胃给药 1 次, I ~ IX 给药组剂量分别为 62, 35.8, 44.8, 60, 45, 54, 35.8, 44.8, 56 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 对照组灌胃等体积的蒸馏水。各组灌胃给药后 4 h 之内,密切观察小鼠毒性反应情况,包括动物外观,行为活动,精神状态,食欲,大小便及其颜色,被毛,肤色,呼吸及鼻,眼,口腔,生殖器有无异常分泌物,以及死亡情况等。死亡动物及时解剖,观察心、肝、脾、肺、肾等重要脏器有无病变,有病变的送病理检查。药后第 2 d 起,每天观察 1 次,称体重,观察小鼠毒性反应情况。观察期结束 14 d 后,将存活的小鼠处死并解剖,对主要脏器大体病理变化进行肉眼观察。

2.2 小鼠亚急性毒性试验

根据吴茱萸水提取物对小鼠急性毒性试验和作者正在进行的大鼠长期毒性试验的毒性剂量,并综合各药物提取物的特点,每个试验样品设原生药 $16.67 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量,相当于临床剂量的 200 倍。上述小鼠 120 只,雌雄各半,随机分为吴茱萸 3 个基原 9 个产地共 9 个样品组和 1 个正常对照组。各组均按 $15 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃,每天 1 次,连续灌胃 15 d。正常组灌服等体积蒸馏水。分别在给药 0, 7, 14 d 称取动物体重。末次药后,动物禁食不禁水 12 h,水合氯醛(4.5%)腹腔注射麻醉。小鼠腹主动脉采血,分离血清测定 ALT, AST, TG, TC 生化指标;解剖小鼠肝脏并称重,计算肝脏指数。取肝左叶 10% 福尔马林固定,常规石蜡包埋切片,HE 染色,光学显微镜下观察其组织形态变化并照相。

2.3 统计学方法

计量数据用表示,采用 PEMS 3.1 统计软件对各组数据进行方差分析,进行组间比较, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 小鼠急性毒性试验

3.1.1 毒性症状谱 I ~ IX 号样品给药后,各样

品毒性症状产生时间和恢复时间基本一致,主要表现为怠动,小鼠扭体运动,呼吸急促等。怠动的发生时间一般为药后 5 min ~ 4 h;扭体运动发生时间为药后 2 ~ 20 min;呼吸急促发生时间为药后 5 min ~ 4 h。动物给药 4 h 后动物行为活动基本恢复正常。

3.1.2 毒性剂量 I, II, III, VII, VIII, IX 号样品 1 d 单次最大给药量动物均有毒性表现和死亡, IV, V, VI 单次最大给药量有毒性表现但未出现动物死亡,各样品组均难以测出 LD_{50} 。吴茱萸 3 个样品 MTD 分别为生药 62, 35.8, 44.8 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 分别相当于临床日剂量的 746, 431, 540 倍。疏毛吴茱萸 3 个样品 MTD 分别为生药 35.8, 44.8, 56 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 分别相当于临床日剂量的 431, 540, 675 倍。吴茱萸、疏毛吴茱萸毒性无明显差别,毒性大小与产地相关。石虎单次最大给药量灌胃动物,均未出现死亡,但其毒性表现与吴茱萸、疏毛吴茱萸基本一致。石虎 3 个样品最大给药量分别为生药 60, 45, 54 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 分别相当于临床日剂量的 723, 542, 650 倍,见表 1。

表 1 小鼠急性毒性剂量及症状谱

Table 1 Acute toxic dose and symptoms of the nine water extracts in mouse

组别	毒性剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	毒性反应发生率/%		
		怠动	扭体运动	呼吸急促
I	62	100	75	100
II	35.8	10	10	100
III	44.8	10	40	100
IV	60	100	80	100
V	45	100	15	100
VI	54	100	25	100
VII	35.8	10	30	100
VIII	44.8	20	40	100
IX	56	100	80	100

3.2 小鼠亚急性毒性试验

3.2.1 一般表现及体重 I ~ IX 号药材的水提取物灌胃小鼠,每天给药剂量为生药 $16.67 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,灌胃后,小鼠未见明显的毒性反应。药后 7, 14 d 小鼠体重与对照组比较无明显差异。

3.2.2 血液生化指标 药后 15 d, I, II, VII, IX 号组 ALT 升高,与对照组比较有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其余各组 ALT 均有不同程度升高,与对照组比无显著性差异。V, VI, VII, IX 号组 TG 升高,与

对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。AST, TC 与对照组比较无显著性差异, 见表 2。

表 2 对小鼠亚急性毒性试验生化指标影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effect on biochemical indexes in the subacute toxicity test of mouse ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	ALT/U · L ⁻¹	AST/U · L ⁻¹	TG/mmol · L ⁻¹	TC/mmol · L ⁻¹
正常对照	41.40 ± 26.95	93.30 ± 31.84	1.20 ± 0.35	2.61 ± 0.52
I	85.55 ± 51.07 ¹⁾	95.36 ± 28.00	1.36 ± 0.60	2.60 ± 0.53
II	243.78 ± 248.15 ¹⁾	237.44 ± 228.66	1.16 ± 0.49	2.30 ± 0.34
III	51.91 ± 39.54	82.73 ± 29.46	1.27 ± 0.43	2.47 ± 0.57
IV	120.64 ± 128.13	120.27 ± 85.32	1.60 ± 0.71	2.34 ± 0.52
V	57.73 ± 46.35	86.27 ± 32.74	1.74 ± 0.53 ¹⁾	2.51 ± 0.50
VI	51.73 ± 36.98	79.00 ± 33.19	1.71 ± 0.48 ¹⁾	2.50 ± 0.47
VII	85.80 ± 49.55 ¹⁾	96.40 ± 30.67	1.73 ± 0.43 ²⁾	2.58 ± 0.35
VIII	65.13 ± 25.68	105.00 ± 44.51	1.63 ± 0.55	2.48 ± 0.27
IX	101.18 ± 82.37 ²⁾	124.45 ± 61.50	1.76 ± 0.53 ¹⁾	2.35 ± 0.49

注: 与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2.3 肝脏指数及病理检查 I ~ IX号药材的水提取物灌胃小鼠 15 d 后, 解剖取肝脏, 肉眼观察药物组肝脏表面颗粒略显粗糙。正常对照组小鼠肝脏指数为 $41.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, I ~ IX号药材的水提取物小鼠肝脏指数分别为 $60.0, 57.4, 51.4, 52.7, 53.5, 56.9, 55.8, 51.7, 52.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 肝脏指数均明显升高, 与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。光镜下组织病理学检查发现, I ~ IX号药材各组小鼠均可见部分动物肝脏肝细胞胞浆显疏松, 可伴中央静脉和(或)小叶下静脉充血; 其中IV石虎(贵州松桃)2只小鼠肝脏可见明显的肝细胞灶性坏死, 见图 1。

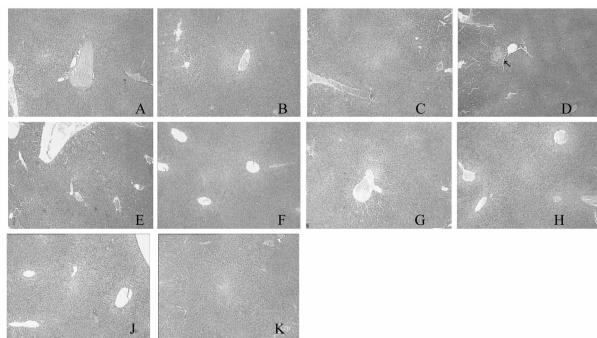
3 讨论

3.1 急性毒性相关性

结果显示, 各试验组小鼠急性毒性症状基本相同; 吴茱萸与疏毛吴茱萸的毒性剂量 (MTD) 无明显差别, 毒性大小与产地相关; 3 个产地石虎水提取物单次最大给药量小鼠均未出现死亡。可能与石虎的提取率略高, 最大给药剂量低于其他 2 个品种有关。至于石虎与吴茱萸, 疏毛吴茱萸急性毒性大小是否存在差异, 有待增加药材产地进一步研究, 才能更加全面的反映吴茱萸基原产地毒性特征。

3.2 肝靶器官毒性相关性

临床有个案报道大剂量服用吴茱萸有剧烈腹痛、头痛、晕厥、呕吐胃内容物、视物不清、错觉、胸闷等症状^[4], 具有中枢神经毒性。黄伟、张茜等^[5-6]研究发现, 肝脏可能是吴茱萸的重要毒性靶器官之一, 亦有报道吴茱萸次碱对 P450 有抑制作用^[7-8]。本研究生化结果显示吴茱萸各基原产地给药组 ALT 均有不同程度升高, 其中吴茱萸、疏毛吴茱萸各有 2 个产地与对照组比较有显著性差异, 石虎 ALT 升高, 但与对照组比较无显著性差异。TG 与对照组比较均有不同程度升高。小鼠肝脏指数与对照组比较均明显升高, 有显著性差异, 各基原之间无明显差异。病理检查显示 I ~ IX号药材各组小鼠均可见部分动物肝脏肝细胞胞浆显疏松, 可伴中央静脉和(或)小叶下静脉充血, 各基原之间病理无明显差别。综上所述, I ~ IX号药材对小鼠均有一定的肝毒性, 各基原之间无明显的毒性大小区别, 毒性大小与产地相关。



A. 吴茱萸(贵州遵义); B. 吴茱萸(重庆合川); C. 吴茱萸(重庆荣昌); D. 石虎(贵州松桃); E. 石虎(湖南黄蕾); F. 石虎(湖南凉伞); G. 疏毛吴茱萸(贵州松桃); H. 疏毛吴茱萸(贵州铜仁); J. 疏毛吴茱萸(贵州玉屏); K. 正常对照组。

图 1 小鼠亚急性毒性试验肝脏病理变化(HE, ×200)

Fig. 1 Morphological change in liver in the subacute toxicity test of mouse(HE, ×200)



3.3 主要化学成分相关性

从本课题组前期对吴茱萸多基原产地 24 个样品化学成分含量测定发现,不同产地不同基原吴茱萸的指纹相似度差异不大,但有效成分吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素含量均有一定的差异,这个差异与吴茱萸品种基原无相关性,主要与产地有关^[9]。有效成分含量与毒性的相关性还有待深入研究。

综上所述,吴茱萸有毒,肝脏为其毒性靶器官之一,其毒性大小与产地关系密切,而与基原似无明显相关性。提示药典将吴茱萸、疏毛吴茱萸、石虎 3 个品种收载在吴茱萸药材项下存在一定的合理性。为了更好的说明吴茱萸多基原和产地的毒性相特征及相关性,需再增加产地样本数,并结合化学研究,进一步明确吴茱萸的毒性物质基础和机制。同时,在中药材质量控制方面,亦可以加入药材的生物质量评价方法,从毒性、药效、化学成分含量多方面综合评价中药材质量的优劣^[10],从而可以改变现在单一依靠对中药已知有效成份分析测定,对中药材质量评价不合理的现状。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010.

[2] 赵军宁,叶祖光. 中药毒性理论与安全性评价[M]. 北京:人民卫生出版社,2012:493.

[3] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2011:109.

[4] 蔡雪映,孟楠,杨冰. 服用吴茱萸过量致中毒 1 例分析[J]. 北京中医,2006,25(3):171.

[5] 黄伟,赵燕,孙蓉. 吴茱萸不同组分对小鼠急性毒性试验比较研究[J]. 中国药物警戒,2010,7(3):129.

[6] 张茜,周绮,金若敏,等. 吴茱萸次碱对肝肾毒性的初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):221.

[7] Rannug U, Agurell E, Rannug A, et al. Certain tryptophan photo products are inhibitors of cytochrome P450-dependent mutagenicity[J]. Environ Mutagen,1992,20(4):289.

[8] Ueng Y F, Jan W C, Lin L C, et al. The alkaloid rutaecarpine is a selective inhibitor of cytochrome P450 1A in mouse and human liver microsomes[J]. Drug Metab Dispos,2002,30(3):349.

[9] 吴燕,黄志芳,舒光明,等. 吴茱萸指纹图谱研究和 3 种成分含量的测定[J]. 中国中药杂志,2010,35(24):3329.

[10] 赵军宁,叶祖光. 中药毒性理论与安全性评价[M]. 北京:人民卫生出版社,2012:85.

Research on toxicity characteristics in Evodia Fructus of different origins and producing areas

LI Li¹, ZHAO Junning^{1*}, YI Jinhai¹, SHU Guangming¹, LI Bo²

(1. Sichuan Academy of Traditional Chinese Medicine Sciences, Traditional Chinese Medicine Quality of the Administration of Traditional Chinese Medicine, Sichuan Provincial Key Laboratory of the Quality and Innovation Research of Chinese Materia Medica, Chengdu 610041, China;
2. Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the toxicity of water extracts from the fruits of Evodia Fructus in different producing areas.

Method: Compare the toxicity of the extracts from different Evodia Fructus on mice by the methods of acute and subacute toxicity test. The mice were given the extracts for 1 d to test the maximal tolerance dose (MTD) or maximal dose and observe the acute toxic symptoms; The mice were given the extracts for 15 d and then detected the level of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and triglyceride (TG). The liver index was calculated, and the liver histological changes were investigated. **Result:** The MTD of water extracts from the fruits of Evodia Fructus is 62, 44.8, 35.84 g · kg⁻¹; the MTD of Evodia Fructus is 56, 44.8, 35.84 g · kg⁻¹; the maximal dose of Evodia Fructus is 60, 54, 45 g · kg⁻¹. The toxic symptoms of the mice which had been given the nine samples were almost consistent. Compared with the control group in subacute toxicity test, the level of serum ALT and the liver index were all increased. The liver histological were changed. **Conclusion:** When water extracts from the fruits of Evodia Fructus are given to mice one or more times. It may be toxic and induce liver damage. There is no significant correlation between the toxicity and Evodia origins, while the toxicity seems to be more closely related to the producing area.

[Key words] Evodia Fructus; origin; habitat; toxicity

doi:10.4268/cjcm20121507

[责任编辑 陈玲]