

苍耳子水提液中苍术苷含量测定及其肝毒性研究

唐小杭¹, 陈 平², 朱娴丹², 黄明珠¹, 陆锦遥¹, 顾胜华¹, 张建强¹, 谷颖敏¹, 田雪松^{2*}

(1. 上海中医药大学创新中药研究院, 上海 201203; 2. 上海中医药大学科技试验中心, 上海 201203)

摘要: **目的** 探讨苍耳子水提液致小鼠肝脏损伤的主要毒性成分及可能毒性机制。**方法** 采用薄层色谱法鉴定苍耳子, 制备苍耳子浸膏粉, 建立苍术苷含量测定方法。SPF 级 ICR 小鼠经灌胃单次给药、30 d 和 90 d 重复给药, 进行毒性试验及毒性机制研究。**结果** 本实验选用的苍耳子质量较佳, 浸膏粉中苍术苷平均质量分数为 27.78 mg/g、羧基苍术苷的含量低于苍术苷含量近 100 倍。急性毒性试验 LD₅₀ 为 18.619 g/kg, 以 LD₅₀ 的 1/5、1/10、1/30 作为重复给药的高、中、低剂量, 分别持续灌胃 30、90 d。30 d 重复给药结束后, 高剂量组雄性小鼠血清 ALT、AST 活性与肝组织 MDA 水平升高 ($P<0.05$), 肝组织呈现小叶中心性肝细胞脂肪变性。90 d 重复给药后, 高剂量组雌、雄小鼠活动均减少、摄食量降低、体质量增长缓慢; 高剂量组雄性小鼠血清 ALT、SOD 活性降低 ($P<0.01$), MDA 水平升高 ($P<0.05$); 高剂量组雌性小鼠 AST、CAT 活性降低 ($P<0.05$), TBIL 水平升高 ($P<0.05$), 肝组织呈现小叶中心性肝细胞脂肪变性, 雄性小鼠肝损伤程度大于雌性小鼠。**结论** 苍耳子中的苍术苷可能是苍耳子水提液的主要毒性成分, 其毒性作用可能与肝组织的脂质过氧化损伤有关。

关键词: 苍耳子; 苍术苷; 肝损伤; 肝毒性; 脂质过氧化

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)12-4180-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.12.046

苍耳子为菊科植物苍耳 *Xanthium sibiricum* Patr. 成熟干燥有总苞的果实, 始载于《神农本草经》, 名为“藟耳实”^[1]。苍耳子具有散风除湿、通鼻窍、祛风湿的功效, 主要用于风寒头痛、鼻渊流涕、风疹瘙痒^[2]。苍耳子相关制剂种类和剂型丰富, 《新编国家中成药》收录治疗鼻炎、鼻窦炎中成药共 38 种, 其中含苍耳子的有 26 种, 占总数的 68%, 如鼻通丸、苍耳子鼻炎胶囊、鼻渊通窍颗粒、鼻炎康片、鼻通滴鼻剂等^[3]。

历代本草中未记载苍耳子有毒, 近年来关于苍耳子中毒的报道逐渐增多。1960 年登封县医院首次报道了苍耳子的临床毒性; 1963 年版及以后的《中国药典》明确记载其有毒。临床报道口服苍耳子所致不良反应中肝损伤最为常见。现代研究表明, 苍耳子的毒性成分主要是毒蛋白、倍半萜内酯类和水溶性苷类。临床上多为服用水煎汤剂后中毒, 有研究认为, 在水提过程中, 毒蛋白经水浸泡和加热后变性, 凝固在细胞中不被溶出, 从而失去毒性^[4]; 而倍半萜内酯类几乎不溶于水^[5]。因此, 苍耳子水煎液中毒性成分主要为苍术苷、羧基苍术苷及其少量衍生物。

本研究采用苍耳子传统水煎煮法制作浸膏粉, 测定苍术苷和羧基苍术苷含量, 并通过小鼠灌胃给药观察其脏器毒性, 以期为苍耳子临床毒性的基础研究及可能毒性成分、毒性机制研究提供试验依据。

1 材料

1.1 试剂与药物 苍耳子药材购于上海康桥中药饮片有限公司, 经复旦大学药学院卢燕教授鉴定为菊科植物苍耳的成熟带总苞的果实。标准品苍术苷二钾盐 (批号 111989-201801, 纯度 92.6%) 购自中国食品药品检定研究院; 丙氨酸氨基转氨酶 (ALT, 批号 207953)、天冬氨酸转氨酶 (AST, 批号 210041)、白蛋白 (ALB, 批号 220808201)、总蛋白 (TP, 批号 220902101)、总胆红素 (TBIL, 批号 207942) 均购于富士胶片和光纯药株式会社。丙二醛 (MDA, 批号 20230408)、过氧化氢酶 (CAT, 批号 20230410)、超氧化物歧化酶 (SOD, 批号 20230411)、微量还原型谷胱甘肽 (GSH, 批号 20230411) 测定试剂盒, 购于南京建成生物工程研究所。乙腈 (批号 K54336330218)、甲醇 (批号 1197007212) 均为色谱纯, 购自德国默克公司; 其他试剂均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司; 水为自制超纯水。

1.2 仪器 日立 7080 全自动生化分析仪 (日本日立科学仪器株式会社); Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); BUCHI 旋蒸仪 (瑞士 BUCHI 公司); SCIENTZ-48 组织匀浆机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); ME203 电子天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); VIP-5 全封闭组织脱水机 (日本樱花株式会社); HistoStar 石蜡包

收稿日期: 2024-04-02

基金项目: 2023 年度上海中医药大学科技发展项目 [23KFL004 (A4-Q230250204)]

作者简介: 唐小杭, 助理实验师, 从事中药毒理学研究。E-mail: js19820209@163.com

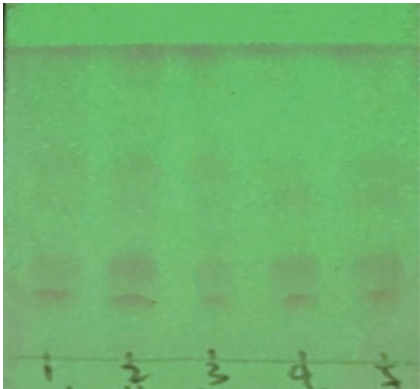
* 通信作者: 田雪松, 研究员, 硕士生导师, 从事中药毒理学研究。E-mail: xuesong.tian@shutcm.edu.cn

埋机、RM2235 轮转式组织切片机（德国莱卡公司）。

1.3 动物 ICR 小鼠，SPF 级，雌雄各半，体质量 20~25 g，购自浙江维通利华试验动物技术有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK（浙）2019-0001]，饲养于上海中医药大学实验动物中心 [实验动物使用许可证号 SYXK（沪）2020-0009]，环境温度 21~23 ℃，相对湿度 48%~68%，换气次数≥15 次/h，人工照明控制，昼夜交替 12 h/12 h。所有实验方案均经过上海中医药大学实验动物伦理委员会审查批准（伦理号 PZSHUTCM220926006）。

2 方法

2.1 苍耳子药材鉴定 采用薄层色谱法，取粉末 2 g，加 25 mL 甲醇，超声处理 20 min，过滤，滤液浓缩至 2 mL，得供试品溶液。另取苍耳子对照药材 2 g，同法制成对照药材溶液。按 2020 年版《中国药典》四部通则“0502 薄层色谱法”，吸取上述 2 种溶液各 4 μL，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以正丁醇-冰醋酸-水（4：1：5）上层溶液为展开剂，展开后取出晾干，置氨蒸气中熏至斑点显色清晰，在 254 nm 波长处检视，见图 1。结果显示，供试品与对照药材色谱相应的位置上显相同颜色斑点，并且苍耳子样品斑点大小均匀，在规定的 1~1.5 cm 范围内，质量较佳。



注：1 为对照品药材，2~5 为样品。

图 1 苍耳子薄层色谱图

2.2 浸膏制备 取干燥苍耳子药材 20 kg，粉碎成颗粒状，8 倍量纯净水浸泡 2 h，煎煮 2 h，过滤。滤渣按相同步骤提取 1 次，合并滤液，浓缩后得到水提物溶液。再加入 4 倍量 95% 乙醇，密闭静置 24 h，上清液旋蒸浓缩后干燥，得到 670 g 浸膏粉，于-80 ℃冰箱保存。

2.3 浸膏中苍术苷含量测定

2.3.1 溶液制备 对照品溶液：精密称取苍术苷二钾盐 5.0 mg，50% 甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中，制成每 1 mL 含苍术苷 500 μg 的溶液，即得。

供试品溶液：取苍耳子浸膏粉 0.05 g，加 25 mL 50% 甲醇，超声处理 25 min，3 000 r/min 离心 10 min，取上清液，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得。

2.3.2 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₈ 色谱柱（4.6 mm×150 mm，5 μm）；流动相乙腈-水（含 0.15% NaH₂PO₄）（20：80）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 35 ℃；检测波长

203 nm；进样量 10 μL。

2.4 急性毒性试验 50 只 ICR 小鼠按性别、体质量随机分成 5 组，每组 10 只，雌雄各半。在预试验和最大溶解度的基础上，给药剂量的从高到低为 22.50、20.25、18.23、16.40、14.70 g/kg，各组小鼠均按照 0.4 mL/10 g 一次性灌胃苍耳子浸膏溶液。仔细观察并记录给药后至 14 d 内小鼠出现的毒性反应与死亡情况。死亡小鼠及时尸检，其他存活小鼠在观察期结束后进行大体解剖，观察心脏、肺脏、肾脏、肝脏、脾脏、胃肠道等脏器是否有出血点、水肿等异常情况，并记录病变情况。当发现器官出现体积、颜色、质地等改变时进行组织病理学检查。

2.5 重复给药毒性试验 重复给药试验 2 次，每次 48 只 ICR 小鼠，按体质量随机分成对照组和低、中、高剂量组，每组 12 只，雌雄各半。在急性毒性试验的基础上，低、中、高剂量组均按 0.2 mL/10 g 灌胃苍耳子浸膏粉 LD₅₀ 的 1/30、1/10、1/5，即 0.062、0.186、0.372 g/kg，对照组小鼠灌胃等体积纯水，每天 1 次，分别灌胃 30、90 d。给药期间每周记录体质量和摄食量。

2.6 血清和肝组织生化检测 小鼠末次给药后禁食不禁水 8 h，麻醉后腹主动脉采血，4 ℃、3 000 r/min 离心 10 min，取血清备用；取血后剖取小鼠肝脏，称重并计算肝脏指数。取小鼠右肝叶，精密称取 0.1 g，冰的生理盐水洗去血渍，滤纸吸干水分，放入离心管内加 0.9 mL 冰的 0.9% 生理盐水，用组织匀浆机研碎（1 000 r/min，10 s，6 次，60 Hz），将制备好的匀浆 10 000 r/min 离心 6 min，取上清液，于-75 ℃冰箱保存备用。按相关试剂盒说明书检测血清 ALT、AST、TBIL、ALB、TP 水平和肝组织 MDA、SOD、CAT、GSH 水平。

2.7 肝组织病理学检查 肝组织固定于 10% 中性福尔马林缓冲液中，脱水包埋后石蜡保存，切成 3 μm 薄片，进行苏木精-伊红（HE）和油红 O 染色，观察肝组织病理学变化。

2.8 统计学分析 通过 SPSS 17.0 软件进行处理，符合正态分布的计量资料以（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

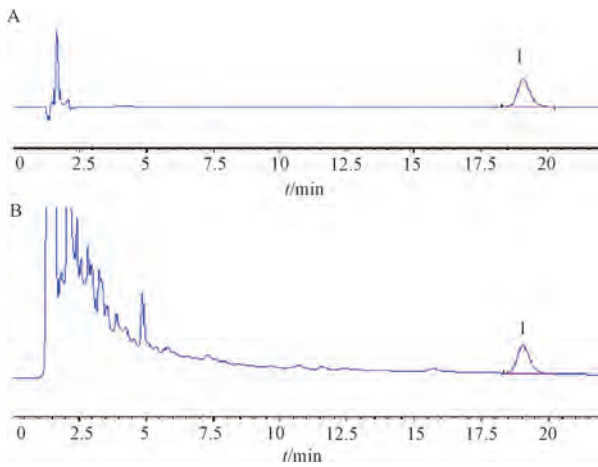
3 结果

3.1 苍术苷含量测定

3.1.1 线性关系考察 精密吸取“2.3.1”项下对照品溶液 0.5、0.25、0.1、0.02、0.01 mL，分别置于 1 mL 量瓶中，加 50% 甲醇定容至刻度，摇匀，在“2.3.2”项色谱条件下进样测定。以进样量为横坐标（ X ），峰面积为纵坐标（ Y ）进行回归，得回归方程为 $Y = 4.356 3X + 4.370 7$ （ $r = 0.999 9$ ），可知苍术苷在 5~250 μg/mL 范围内线性关系良好。各成分 HPLC 色谱图见图 2。

3.1.2 精密度试验 精密吸取“2.3.1”项下供试品溶液，在“2.3.2”项色谱条件下进样测定 6 次，测得苍术苷峰面积 RSD 为 0.31%，表明仪器精密度良好。

3.1.3 稳定性试验 精密吸取“2.3.1”项下供试品溶液，室温下于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.3.2”项色谱条件



1. 苍术苷

图 2 对照品 (A) 和苍耳子浸膏 (B) HPLC 色谱图

下进样测定，测得苍术苷峰面积 RSD 为 1.91%，表明溶液 24 h 内稳定性良好。

3.1.4 重复性试验 取同一批浸膏粉末 6 份，每份 0.05 g，精密称定，按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液，在“2.3.2”项色谱条件下进样测定，测得苍术苷峰面积 RSD

为 0.55%，表明该方法重复性良好。

3.1.5 加样回收率试验 取含量已知的苍耳子浸膏粉样品 5 份，每份 0.05 g，精密称定，准确加入“2.3.1”项下对照品溶液 1 mL，按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液，在“2.3.2”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，苍术苷平均加样回收率为 103.19%，RSD 为 0.31%。

由于苍耳子毒性成分羧基苍术苷仅比苍术苷在同一碳原子上多一个羧基，在加热、炒制、干燥等热处理过程中会转化为结构更加稳定的苍术苷^[6]，苍耳子浸膏中其含量约为 0.03%，相比苍术苷含量相差近 100 倍，故在随后的试验中不再考虑羧基苍术苷的毒性作用。

3.2 急性毒性试验 给药后 15 min，高剂量组小鼠活动减少，呼吸急促，出现跳跃颤抖现象，严重的出现间歇性惊厥、抽搐、呼吸停止而死亡。高剂量组小鼠死亡时间均在给药后 30 min 至 2 h 内，随着剂量降低，从灌胃到小鼠死亡之间的时间延长，反应程度降低。死亡小鼠解剖肉眼观察未见明显异常；存活小鼠在给药后约 6 h 基本恢复正常，至给药后 14 d 动物行为活动、摄食、饮水未见异常，被毛光滑润。苍耳子浸膏粉灌胃给药的 LD₅₀ 及其 95% 可信限见表 1。

表 1 苍耳子水提液急性毒性试验结果 (n=10)

组别	动物编号	给药剂量/(g·kg ⁻¹)	动物数/只	死亡数/只	LD ₅₀ 及 95% 可信限
1	雌 1001-1005	22.50	10	10	18.619 g/kg (17.655~19.644)
	雄 1101-1105				
2	雌 2001-2005	20.25	10	7	
	雄 2101-2105				
3	雌 3001-3005	18.23	10	5	
	雄 3101-3105				
4	雌 4001-4005	16.40	10	1	
	雄 4101-4105				
5	雌 5001-5005	14.70	10	0	
	雄 5101-5105				

3.3 苍耳子水提液 30 d 重复给药试验

3.3.1 30 d 重复给药对小鼠体质量及肝脏指数的影响

30 d 给药结束后，各组小鼠体质量、肝脏质量、肝脏指数均无显著差异 (P>0.05)，见图 3、表 2~3。

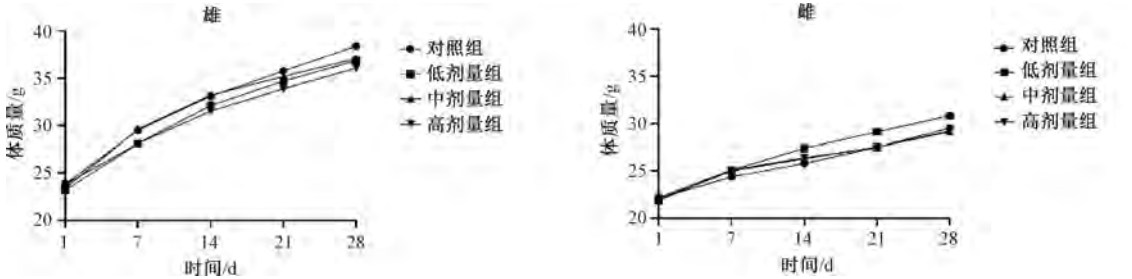


图 3 苍耳子水提液灌胃 30 d 对小鼠体质量的影响 (n=6)

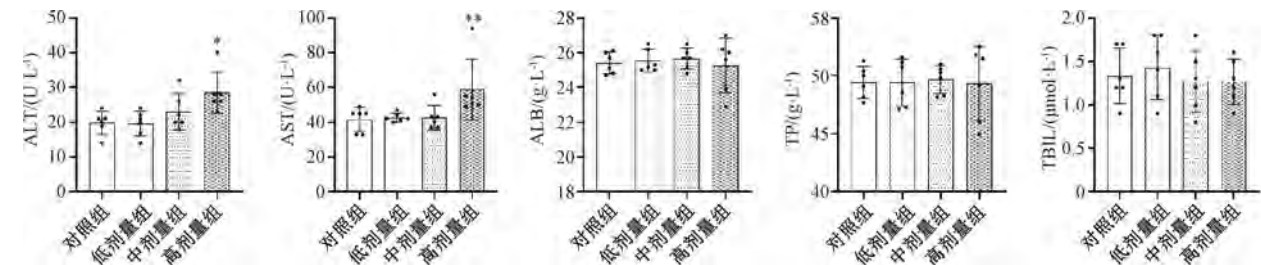
表 2 苍耳子水提液灌胃 30 d 对雄性小鼠体质量和肝脏指数的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=6)

组别	0 d 体质量/g	30 d 体质量/g	肝脏质量/g	肝脏指数/%
对照组	23.8±1.6	36.1±2.9	1.660±0.304	4.573±0.497
低剂量组	23.2±1.7	34.9±1.5	1.545±0.118	4.573±0.497
中剂量组	23.4±1.7	35.1±2.2	1.571±0.158	4.469±0.288
高剂量组	23.8±1.5	34.2±1.7	1.588±0.134	4.649±0.344

表 3 苍耳子水提液灌胃 30 d 对雌性小鼠体质量和肝脏指数的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	0 d 体质量/g	30 d 体质量/g	肝脏质量/g	肝脏指数/%
对照组	22.1±0.9	27.0±1.7	1.132±0.114	4.203±0.411
低剂量组	21.9±0.9	29.0±0.9	1.270±0.076	4.386±0.229
中剂量组	22.0±0.9	28.0±2.2	1.208±0.210	4.308±0.569
高剂量组	22.2±0.9	27.0±0.8	1.114±0.137	4.121±0.425

3.3.2 30 d 重复给药对小鼠血清生化指标的影响 给药结束后,与对照组比较,高剂量组雄性小鼠 AST、AST 活性升高 ($P<0.05$, $P<0.01$),其余组各指标均无显著差异 ($P>0.05$),见图 4~5。



注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 4 苍耳子水提液灌胃 30 d 对雄性小鼠血清生化指标的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

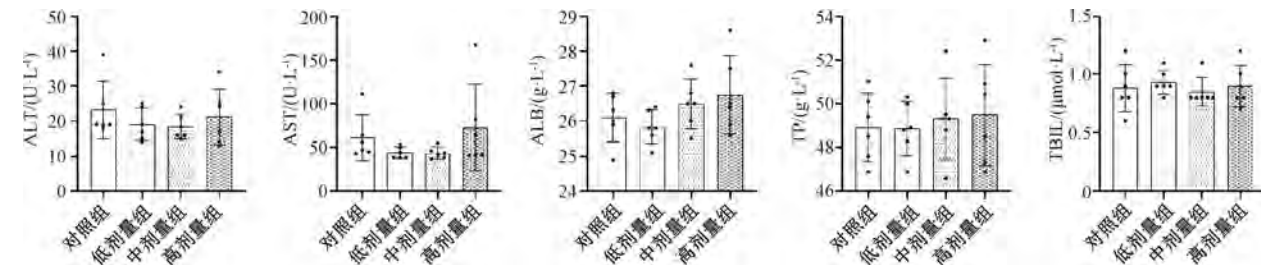
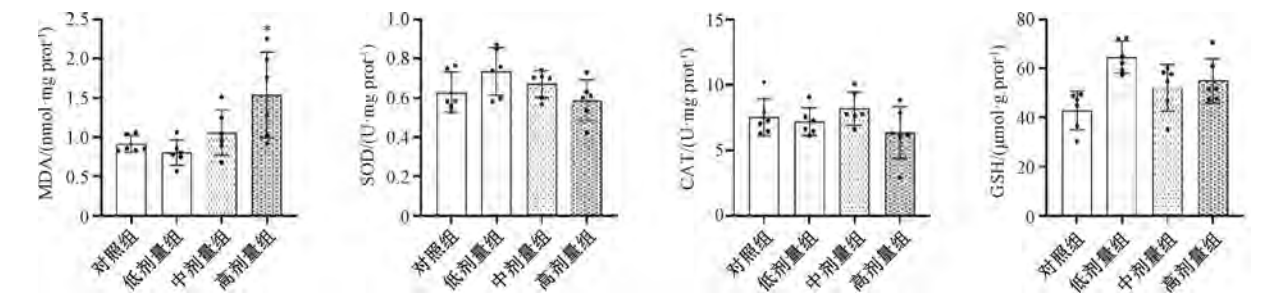


图 5 苍耳子水提液灌胃 30 d 对雌性小鼠血清生化指标的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

3.3.3 30 d 重复给药对小鼠肝组织匀浆生化指标的影响 给药结束后,与对照组比较,高剂量组雄性小鼠肝组织 MDA 水平升高 ($P<0.05$),其余组各指标均无显著差异 ($P>0.05$),见图 6~7。



注:与对照组比较,* $P<0.05$ 。

图 6 苍耳子水提液灌胃 30 d 对雄性小鼠肝组织匀浆生化指标的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

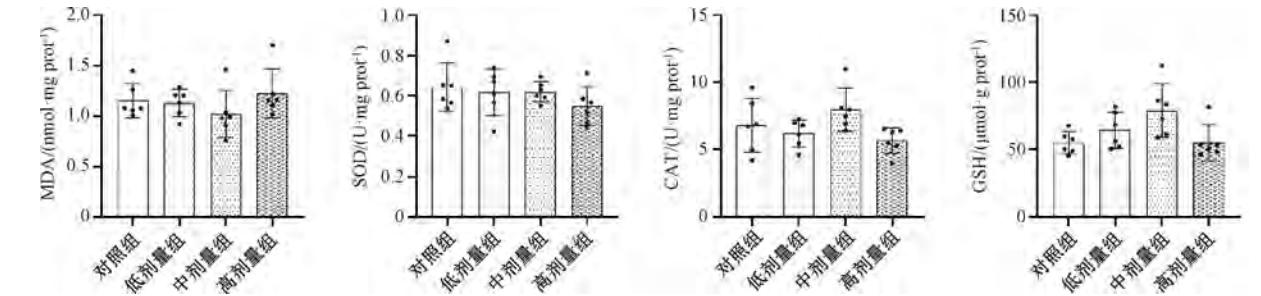


图 7 苍耳子水提液灌胃 30 d 对雌性小鼠肝组织匀浆生化指标的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

3.3.4 肝组织病理学观察 HE 染色（图 8）结果显示，对照组小鼠肝脏可见肝小叶排列整齐，肝组织轮廓清晰，细胞呈多边形，分界清晰，肝细胞核大而圆，细胞质呈嗜酸性；低、中剂量组雄、雌性小鼠肝组织结构和细胞形态与对照组相似，未见肝细胞坏死、变性或异常病变；而高剂量组雄性小鼠出现程度不一的肝细胞变化，胞质呈弱嗜酸性，其内可见大小不等的空泡，出现小叶中心性肝细胞

空泡变性。油红 O 染色（图 9）进一步分析肝细胞的空泡成分，发现空泡被染成红色，确认 HE 染色镜下的空泡成分为脂肪，提示高剂量组雄性小鼠肝脏的组织病理学变化为小叶中心性肝细胞脂肪变性。为进一步观察苍耳子的毒性，继续以相同的给药剂量进行了 90 d 重复给药毒性试验，以期通过更长的给药时间，观察苍耳子浸膏对动物的影响。

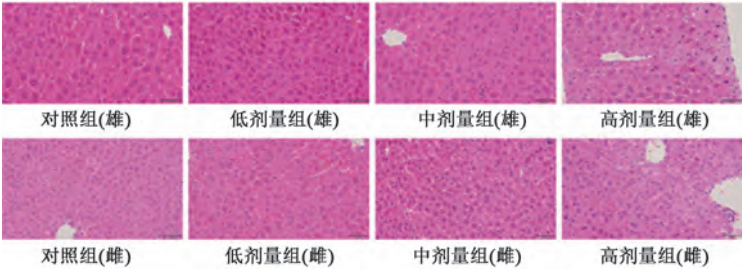


图 8 苍耳子水提液灌胃 30 d 对小鼠肝组织病理变化的影响（HE 染色，×400）

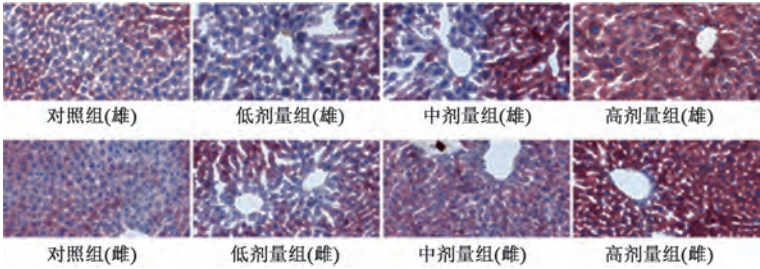
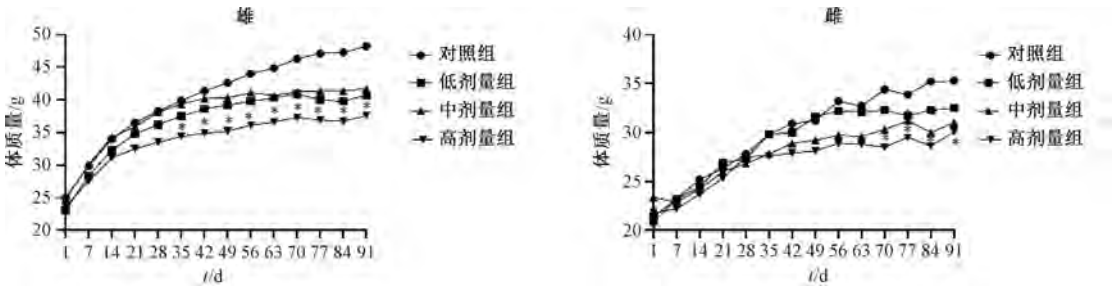


图 9 苍耳子水提液灌胃 30 d 对小鼠肝组织病理变化的影响（油红 O 染色，×400）

3.4 苍耳子水提液 90 d 重复给药毒性试验

3.4.1 90 d 重复给药对小鼠体质量及肝脏指数的影响 与对照组比较，高剂量组雌雄动物活动减少、摄食量降低、体质量增长缓慢。与对照组比较，从 35 d 到给药结束，高

剂量组雄性小鼠体质量降低 ($P<0.05$)；从 70 d 到给药结束，高剂量组雌性小鼠体质量降低 ($P<0.05$)；各组小鼠肝脏指数无显著差异 ($P>0.05$)，见图 10、表 4~5。



注：与对照组比较，* $P<0.05$ 。

图 10 苍耳子水提液灌胃 90 d 对小鼠体质量的影响（ $n=5$ ）

表 4 苍耳子水提液灌胃 90 d 对雄性小鼠体质量和脏器的影响（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=5$ ）

组别	0 d 体质量/g	90 d 体质量/g	肝脏质量/g	肝脏指数/%
对照组	25.0±1.0	45.6±6.1	1.809±0.187	3.981±0.271
低剂量组	23.1±0.7	38.1±1.9	1.502±0.088	3.940±0.055
中剂量组	24.8±1.0	39.5±2.1	1.591±0.111	4.028±0.244
高剂量组	23.6±0.6	35.2±2.3*	1.331±0.157	3.779±0.310

注：与对照组比较，* $P<0.05$ 。

3.4.2 90 d 重复给药对小鼠血清生化指标的影响 给药组雄、雌小鼠 ALT、AST 活性随给药剂量增加而降低，雌性

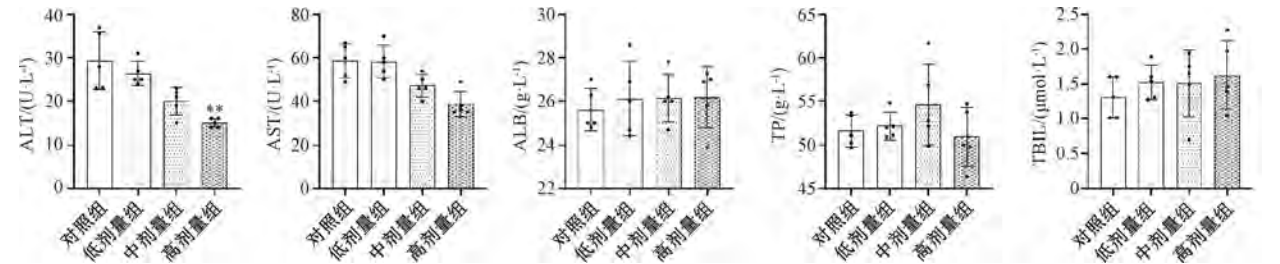
小鼠 TBIL 水平随给药剂量增加而升高。与对照组比较，高剂量组雄性小鼠 ALT 活性降低 ($P<0.01$)，高剂量组雌性

小鼠 AST 活性降低 ($P<0.05$), TBIL 水平升高 ($P<0.05$), 11~12。
其余组小鼠血清生化指标无显著差异 ($P>0.05$), 见图

表 5 苍耳子水提液灌胃 90 d 对雌性小鼠体质量和脏器的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

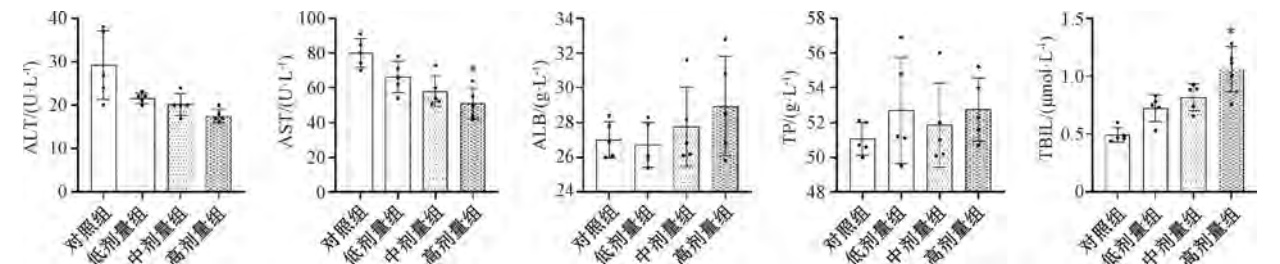
组别	0 d 体质量/g	90 d 体质量/g	肝脏质量/g	肝脏指数/%
对照组	20.8±1.2	32.6±4.6	1.501±0.192	4.626±0.373
低剂量组	21.4±1.1	31.2±1.9	1.353±0.100	4.331±0.162
中剂量组	23.4±0.2	28.1±1.6	1.181±0.142	4.197±0.476
高剂量组	21.8±0.7	27.9±0.6 [*]	1.084±0.107	3.892±0.379

注: 与对照组比较, $^*P<0.05$ 。



注: 与对照组比较, $^{**}P<0.01$ 。

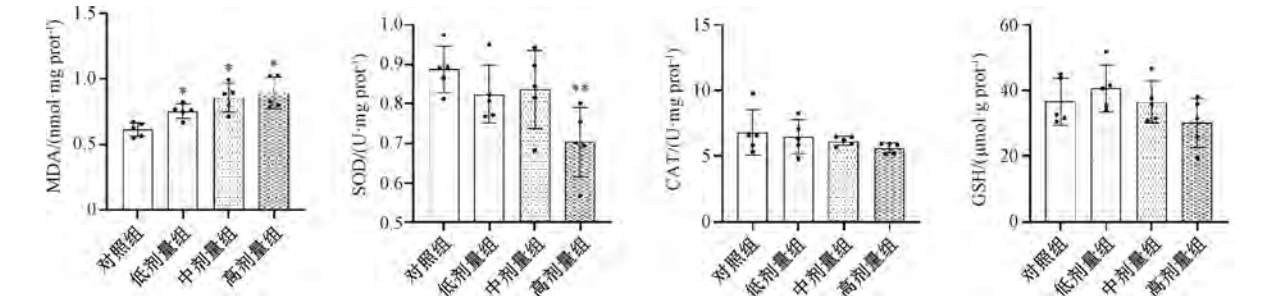
图 11 苍耳子水提液灌胃 90 d 对雄性小鼠血清生化指标的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)



注: 与对照组比较, $^*P<0.05$ 。

图 12 苍耳子水提液灌胃 90 d 对雌性小鼠血清生化指标的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

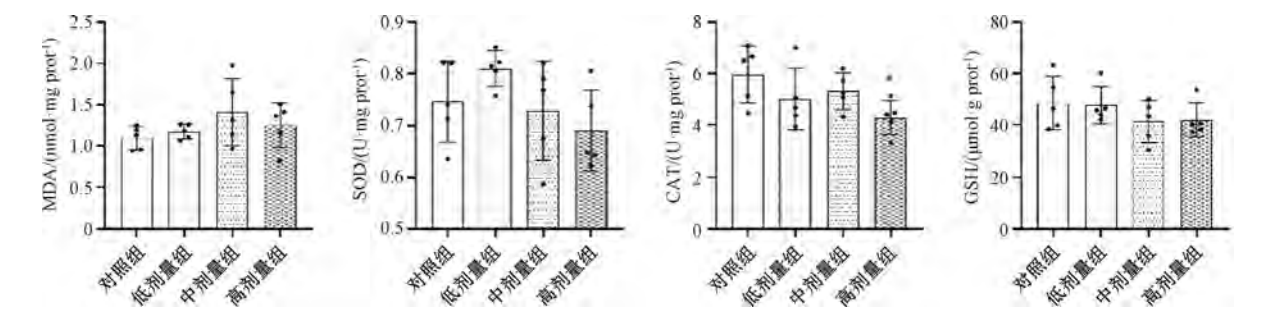
3.4.3 90 d 重复给药对小鼠肝组织匀浆生化指标的影响 与对照组比较, 雄性小鼠各剂量组 MDA 水平升高 ($P<0.05$), 雄性小鼠高剂量组 SOD 活性降低 ($P<0.01$), 雌性小鼠高剂量组 CAT 活性降低 ($P<0.05$), 见图 13~14。



注: 与对照组比较, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

图 13 苍耳子水提液灌胃 90 d 对雄性小鼠肝组织生化指标的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

3.4.4 肝组织病理学观察 HE 染色 (图 15) 结果显示, 对照组小鼠肝脏可见肝小叶排列整齐, 肝细胞轮廓清晰, 细胞呈多边形, 分界清晰, 肝细胞核大而圆, 细胞质呈嗜酸性; 各剂量组雌性小鼠肝组织结构和细胞形态与对照组相似, 未见肝细胞坏死、变性或异常病变; 中、高剂量组雄性小鼠出现程度不一的肝细胞变化, 胞质弱嗜酸性, 其内可见大小不等的空泡, 出现小叶中心性肝细胞空泡变性。油红 O 染色 (图 16) 进一步分析肝细胞的空泡成分, 发现空泡被染成红色, 确认 HE 染色镜下的空泡成分为脂肪, 提示雄性中、高剂量组小鼠肝组织病理学变化为小叶中心性肝细胞脂肪变性。以上结果提示, 肝损伤在发生率、分布范围和病变程度上, 随剂量升高而增加, 呈一定的剂量相关性; 并且存在性别选择, 雄性小鼠的毒性反应大于雌性小鼠。



注：与对照组比较，* $P<0.05$ 。

图 14 苍耳子水提液灌胃 90 d 对雌性小鼠肝组织生化指标的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

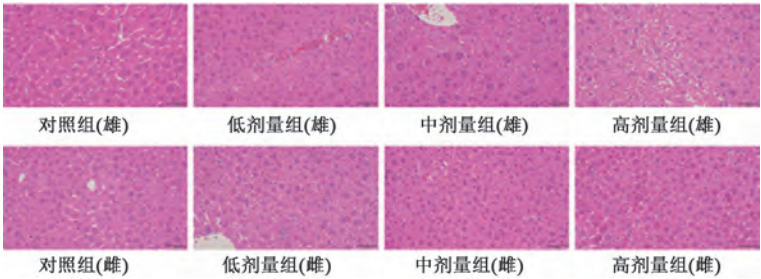


图 15 苍耳子水提液灌胃 90 d 对小鼠肝组织的影响 (HE 染色, $\times 400$)

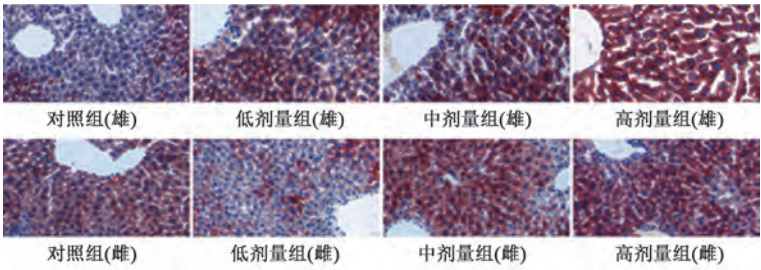


图 16 苍耳子水提液灌胃 90 d 对小鼠肝组织的影响 (油红 O 染色, $\times 400$)

4 讨论

在毒理学试验中，通常根据急性毒性试验结果来选择重复给药毒性试验剂量。一般设 3 个剂量组和 1 个对照组。高剂量组应能引起明显的毒性或少量动物的死亡（少于 10%），中剂量约相当于观察到有害作用的最低剂量，低剂量组应无毒性反应。高剂量一般为 LD₅₀ 的 1/5~1/20。高、中、低剂量距离以 3~10 倍为宜，不少于 2 倍^[7]。因此，本实验以 LD₅₀ 的 1/5、1/10、1/30 作为高、中、低剂量。

肝脏是人体物质代谢中枢，亦是常见的毒性靶器官，主要通过检测血清 AST、ALT、TBIL 等水平升高程度评价肝脏损害程度^[8-9]。30 d 重复给药试验中，随剂量增加，雌、雄小鼠血清 ALT、AST 水平升高；与对照组比较，高剂量组雄性小鼠血清指标有显著性差异，而雌性小鼠无显著性差异，提示苍耳子肝毒性对小鼠有性别差异。90 d 重复给药试验中，雌、雄小鼠血清 ALT、AST 水平随剂量增加出现下降趋势，可能与长期给药、动物体质量下降有关^[10]。课题组前期在山豆根毒性研究中亦有类似发现，即给予毒性剂量的山豆根后动物血清 ALT、AST 水平降低与其体质量下降有关^[11]。研究显示，胃肠道功能下降与苍术

苷所致线粒体 ATP 减少和 ROS 水平上升有关^[12-13]。氧化应激导致线粒体功能障碍、损伤细胞功能，造成功能性消化不良、胃肠道动力障碍^[14-15]，最终动物消瘦，肝血清生化指标降低。此外，90 d 给药毒性试验雌性高剂量组 TBIL 水平上升，提示苍耳子致肝毒性也可能与胆汁淤积有关^[16]。

肝脏作为生化代谢中心，是脂质过氧化最敏感的器官之一。机体内氧自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸，引发脂质过氧化^[17-18]。脂质过氧化被认为是组织损伤的基本机制之一。脂质过氧化物包括 MDA、烷烃等，其中 MDA 是最重要的常用标志物，其含量增加可反映脂质过氧化损伤的程度^[19]。机体抗氧化酶促系统主要由 SOD、CAT、GSH 等相互协调配合，共同维持机体内氧平衡。SOD 首先将超氧阴离子催化为 H₂O₂ 或氢过氧化物^[20]。其次 CAT 继续将有害的 H₂O₂ 分解为 H₂O 和 O₂^[21]，在谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）的催化下，还原型谷胱甘肽（GSH）将体内的氢过氧化物还原为 H₂O 并且自身被氧化为氧化型谷胱甘肽（GSSH），阻断脂质过氧化反应^[22]。3 种酶的活力高低反映了机体清除自由基的能力。本次 30 d 重复给药试验显示，雄性高剂量组 MDA 水平升高。但其余组别指标差异

未见显著性。90 d 给药结果显示，雄性各剂量组 MDA 水平均升高，雄性高剂量组 SOD 水平降低，雌性高剂量组 CAT 水平降低，提示苍耳子对肝脏具有脂质过氧化损伤作用。这可能与苍术苷攻击细胞膜中不饱和脂肪酸，产生大量自由基，破坏肝脏内氧化与抗氧化系统平衡有关。但 30 d 给药试验雌、雄低剂量组 GSH 水平升高，雄性低剂量组 MDA 水平降低，提示脂质过氧化水平下降。这和高剂量组的脂质过氧化损伤结果相反，原因可能是低浓度的苍术苷会促进肝细胞内脂肪溶解^[23]，降低线粒体活性氧活力、减少脂质过氧化水平^[24]。

MacLeod 等^[25]从苍耳中提取了 2 种水溶性毒性糖苷类成分，鉴定为苍术苷和羧基苍术苷。汪洋等^[26]用苍术苷单体对动物进行急性和重复毒性试验，结果显示与水提物呈现相同的毒性反应。此外，本实验发现，水提浸膏中羧基苍术苷的含量甚微，毒性作用可以忽略。因此，苍耳子水提浸膏里的毒性成分可能是苍术苷。

综上所述，苍耳子中的苍术苷可能是苍耳子水提液肝毒性的主要毒性成分，毒性机制可能与肝组织的脂质过氧化损伤有关。本实验为苍耳子的体内外毒理试验及临床毒性研究提供了可靠的依据。

参考文献:

[1] 佚名. 神农本草经[M]. 孙星衍, 辑. 南宁: 广西科学技术出版社, 2016: 074.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 162.

[3] 刘传梦, 陈海鹏, 谭柳萍, 等. 苍耳子药理作用及毒性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(9): 207-213.

[4] 宋振玉, 张凌云, 谢明智, 等. 苍耳子的有毒成分及其药理作用[J]. 药学报, 1962, 9(11): 678-684.

[5] Zhang J, Zhao R, Jin L, *et al.* Xanthanolides in *Xanthium* L: Structures, synthesis and bioactivity [J]. *Molecules*, 2022, 27(23): 8136.

[6] 刘 鹏. 羧基苍术苷、苍术苷含量测定新方法 & 转化规律研究[D]. 泸州: 西南医科大学, 2016.

[7] 周志俊. 基础毒理学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2008: 95.

[8] 杜 斌, 蔡维维, 陈俊良, 等. 25% 四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤模型血清 AST、ALT 水平变化[J]. 现代医药卫生, 2018, 34(8): 1121-1122; 1127.

[9] Xu H M, Chen Y, Xu J, *et al.* Drug-induced liver injury in hospitalized patients with notably elevated alanine aminotransferase[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(41): 5972-5978.

[10] Kim K W, Song M Y, Chung S H, *et al.* Effect of modified fasting therapy on body weight, fat and muscle mass, and blood chemistry in patients with obesity[J]. *Tradit Chin Med*, 2016,

36(1): 57-62.

[11] Wang L P, Lu J Y, Sun W, *et al.* Hepatotoxicity induced by *Radix Sophorae Tonkinensis* in mice and increased serum cholinesterase as a potential supplemental biomarker for liver injury[J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2017, 69(4): 193-202.

[12] 杨桂蓉. 苍术苷的致突变性观察及对氧化磷酸化的抑制作用研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2012.

[13] Santi R. Potassium atractylate, a new inhibitor of the tricarboxylic acid cycle[J]. *Nature*, 1958, 182(4630): 257.

[14] 吕 林, 王风云, 唐旭东, 等. 脾虚一号方对脾虚型 FD 大鼠肝脏异柠檬酸脱氢酶的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2016, 24(32): 8.

[15] Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, *et al.* Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases[J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(2): 329-354.

[16] 金 勇. 苍耳子毒性部位筛选及其量时毒关系的研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2010.

[17] Sánchez-Alcázar J A, Schneider E, Martínez M A, *et al.* Tumor necrosis factor- α increases the steady-state reduction of cytochrome b of the mitochondrial respiratory chain in metabolically inhibited L929 Cells [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(18): 13353-13361.

[18] Onetti Y, Dantas A P, Belen Pérez, *et al.* Peroxynitrite formed during a transient episode of brain ischaemia increases endothelium-derived hyperpolarization-type dilations in thromboxane/prostaglandin receptor-stimulated rat cerebral arteries[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2017, 220(1): 150-166.

[19] 杜时雨, 房 龙, 赵洪川, 等. 脂质过氧化反应在大鼠急性酒精性肝损害中的作用[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2008, 17(7): 600-602.

[20] Gressner A M, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets [J]. *Cell Mol Med*, 2006, 10(1): 76-99.

[21] Cederbaum A I, Lu Y K, Wu D F. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury[J]. *Arch Toxicol*, 2009, 83(6): 519-548.

[22] 赵珂立. 氧化应激对动物自由基代谢、消化道损伤及抗氧化剂干预作用的研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2011.

[23] 李丽君, 张鹏飞, 曾常春, 等. 苍术苷在制备治疗脂肪肝肝的药物中应用: 中国, CN202010971521. 7[P]. 2024-03-04.

[24] 郭一帆, 陈佩杰, 肖卫华. 肥胖状态下脂肪组织线粒体功能紊乱与运动调控[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2020, 36(10): 1145-1150.

[25] MacLeod J K, Moeller P D, Franke F P. Two toxic kaurene glycosides from the burrs of *Xanthium pungens*[J]. *J Nat Prod*, 1990, 53(2): 451-455.

[26] 汪 洋. 中药苍耳子的毒性物质基础及中毒机制研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2010.