

补骨脂素和异补骨脂素的急性毒性和相互作用

白茹玉¹, 张盼阳¹, 毕亚男¹, 张 玥¹, 王跃飞¹, 孙力康², 周 昆^{1,3*}

1. 天津中医药大学 中医药研究院, 天津 300193

2. 天津中医药大学 中西医结合学院, 天津 300193

3. 天津市中药药理学重点实验室, 天津 300193

摘要: **目的** 探究补骨脂素、异补骨脂素的急性毒性及两者(1:1)混合使用后的相互作用。**方法** 补骨脂素(1 125、843、633、475 mg/kg)、异补骨脂素(475、404、343、292 mg/kg)以及两者1:1的混合物(633、538、457、389、330 mg/kg) 1次性ig给予小鼠,连续观察并记录14 d小鼠的毒性反应和死亡情况,用SPSS计算补骨脂素、异补骨脂素以及两者混合使用后的半数致死量(LD₅₀),用等效线图解法判断两者的相互作用。**结果** 给药组小鼠均出现僵直、腹部贴地、活动力减弱,甚至抽搐、口眼周有分泌物,心率减慢直至死亡的现象,与助溶剂组比较,体质量呈降低趋势;补骨脂素LD₅₀为638.69 mg/kg,95%可信限为526.91~785.78 mg/kg;异补骨脂素LD₅₀为351.72 mg/kg,95%可信限为248.17~394.57 mg/kg;两者1:1混合给药的LD₅₀为454.66 mg/kg,95%可信限为422.58~489.59;两者合用的LD₅₀在补骨脂素和异补骨脂素相加等效线上。**结论** 补骨脂素和异补骨脂素大剂量给予小鼠时,引起药物急性毒性反应,1:1混合给药具有相加作用。

关键词: 补骨脂素; 异补骨脂素; 急性毒性; 相加作用

中图分类号: R994.21 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)06-1068-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.06.023

Acute toxicity and drug interaction of psoralen and isopsoralen

BAI Ruyu¹, ZHANG Panyang¹, BI Yanan¹, ZHANG Yue¹, WANG Yuefei¹, SUN Likang², ZHOU Kun^{1,3}

1. Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Integrative Medicine College of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

3. Tianjin Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To investigate the acute toxicity of the psoralen and isopsoralen, and then explored the interaction between them after mixed use. **Methods** The different-dose psoralen (1 125, 843, 633 and 475 mg/kg), isopsoralen (475, 404, 343 and 292 mg/kg), and their mixture solution of 1:1 (633, 538, 457, 389 and 330 mg/kg) were ig administrated to the mice, then the toxicity reaction and the mortality of the mice were continuously observed and recorded for 14 days, then LD₅₀ value of them was calculated by SPSS analysis, finally the drug interaction between them was concluded with equivalent diagram method. **Results** even convulsion, secretion around the mouth and eyes, and slowed heart rate until death. All the mice in the treatment group showed rigidity, abdomen sticking to the ground, weakened activity, even convulsions, secretions around the mouth and eyes, heart rate slowing down until death. Compared with the cosolvent group, the body mass showed a decreasing trend. The LD₅₀ of psoralen was 638.69 mg/kg, and the 95% confidence limit was 526.91 - 785.78 mg/kg; while LD₅₀ of ispsoralen was 351.72 mg/kg, and the 95% confidence limit was 422.58 - 489.59. The LD₅₀ for their mixture of 1:1 was 454.66 mg/kg, and its 95% confidence limit was 422.58 - 489.59. Besides, the LD₅₀ for their mixture was above the additive equivalent line. **Conclusion** The acute toxicity of drugs in mice was induced by the megadose of psoralen and isopsoralen, while there was an additive effect with 1:1 mixed of psoralen and isopsoralen.

Key Words: psoralen; isopsoralen; acute toxicity; additive effect

补骨脂别名破故纸、黑故子,是豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L.的干燥成熟果实^[1],传统中医理论认为补骨脂具有温肾助阳、升达脾胃、平喘止泻的功效。补骨脂中的化学成分包括香豆素类、

收稿日期: 2018-01-25

基金项目: 重大新药创制专项(2014ZX09304307-001-005); 国家自然科学基金资助项目(81703790)

第一作者: 白茹玉(1993-),女,硕士研究生。E-mail: 823923887@qq.com

*通信作者: 周 昆(1978-),男,副研究员。E-mail: z.k.ken@263.net

黄酮类、单萜酚类、脂肪类、甾醇类等多种化合物^[2-3],其中香豆素类成分补骨脂素和异补骨脂素是《中国药典》中规定的补骨脂药材质量控制成分,药典要求两者含量之和不低于0.7%。现代研究表明,补骨脂可以增强机体免疫调节,增加皮肤对紫外线的敏感性,在临床上主要用于治疗白癜风、银屑病等皮肤病^[4];实验研究发现,补骨脂有雌激素样作用,能够促进成骨细胞增殖分化,降低骨质流失^[5-8],在临床上可用于治疗更年期综合症、骨质疏松等^[9-10];郭江宁等^[11]通过形态学、MTT实验证明了补骨脂素和异补骨脂素对胃癌细胞的增殖有抑制作用,且抑制率与药物浓度呈正相关。此外,中药补骨脂还具有强心、增强免疫、抗菌抗炎、平喘止泻等作用。尽管补骨脂药理作用及临床应用广泛,但其引起的药物不良反应不容忽视。

补骨脂的毒性记载最早见于《雷公炮制法》,其他文献对其毒性都鲜有报道。研究发现^[12],补骨脂水提物可以导致大鼠肝损害、肝脏系数增高,出现脂肪肝等病变,水提物中含有的主要成分是补骨脂苷、异补骨脂苷、补骨脂素、异补骨脂素;补骨脂苷和异补骨脂苷可通过胃肠微环境转化为补骨脂素和异补骨脂素^[13-14],因此推测补骨脂素和异补骨脂素为毒性成分。补骨脂素和异补骨脂素的急性毒性尚未见报道,本实验对补骨脂素、异补骨脂素和两者1:1混合使用进行了急性毒性评价。

1 材料

1.1 药物和主要试剂

补骨脂素和异补骨脂素(质量分数>98%,批号分别为201501、201502),均购于天津月牙湖科技有限公司。黄著树胶粉,北京索莱宝科技有限公司。

1.2 动物

SPF级ICR小鼠,4~6周龄,体质量18~20g,购于北京华阜康生物科技有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2014-0004。动物饲养于天津中医药大学动物实验中心,环境温度20~25℃,湿度40%~60%,自由摄食和饮水,12h光照。

1.3 主要仪器

JA1003电子分析天平,上海恒平科技仪器有限公司;LT1000B电子天平,常熟市天量仪器有限公司。

2 方法

2.1 助溶剂的急性毒性考察

ICR小鼠称体质量后随机分为对照组和助溶剂

组,每组10只,雌雄各半。给药前,小鼠禁食不禁水12h,助溶剂组ig黄著树胶溶液0.4mL/10g,对照组给予等量纯水,1次性给药。连续观察2周给药后小鼠的毒性反应,并于给药后的1、5、8、14d称存活小鼠体质量。

2.2 补骨脂素和异补骨脂素单独及混合给药半数致死量(LD₅₀)试验

将130只小鼠随机分组,每剂量组10只,雌雄各半。根据预实验结果设置:补骨脂素组4个剂量分别为1125、843、633、475mg/kg,异补骨脂素4个剂量分别为475、404、343、292mg/kg,补骨脂素、异补骨脂素按照1:1混合,5个剂量设置为633、538、457、389、330mg/kg。禁食不禁水12h后,对小鼠进行0.4mL/10g体积ig给药处理,1次性给药。连续2周观察小鼠毒性反应、体质量和死亡情况并记录。应用SPSS 11.5统计学软件,采用Probit回归法计算LD₅₀数值和95%可信限。

2.3 等效线分析

两种药物的药效学相互作用是协同还是拮抗,通常根据其联合应用时的药效是强于还是弱于两药单独应用时的效应之和来定义的。如两种药物混合使用时的ED₅₀落在相加线上,则提示两种药物为相加作用,如位于相加线下方,为协同作用,反之则为拮抗^[15]。

3 结果

3.1 补骨脂素、异补骨脂素及混合(1:1)使用LD₅₀

助溶剂组、对照组小鼠在给药后2周内均活动自如,无死亡情况,亦无毒性反应;对两组动物的体质量进行统计分析,无显著差异。判定助溶剂对小鼠无明显急性毒性。

补骨脂素、异补骨脂素及混合给药组小鼠给药后均出现僵直、腹部贴地、活动力减弱,甚至抽搐、口眼周有分泌物,心率减慢直至死亡的现象。与对照组比较,异补骨脂及1:1混合物给药后,小鼠的体质量均呈降低趋势,且剂量越大越明显,结果见表1。

补骨脂素1125mg/kg组小鼠前3天死亡率达到100%,633、475mg/kg组前3天死亡率达到30%;异补骨脂素475、292mg/kg组小鼠的死亡率分别为80%、30%,单独给予补骨脂素和异补骨脂素药物的剂量均未达到最低致死剂量。ig给予补骨脂素和异补骨脂素(1:1)混合物后,633mg/kg组小鼠

的死亡率为 100%，小鼠死亡状态与补骨脂素、异补骨脂素相同，而剂量为 330 mg/kg 时未见小鼠死亡。通过 SPSS 11.5 软件计算得：补骨脂素的 LD₅₀ 为 638.69 mg/kg，95%可信限为 526.91~785.78 mg/kg；异补骨脂素 LD₅₀ 为 351.72 mg/kg，95%可

信限为 248.17~394.57 mg/kg。补骨脂素与异补骨脂素 1:1 混合给药的 LD₅₀ 为 454.66 mg/kg，95%可信限为 422.58~489.59 mg/kg。采用文献^[16]中方法计算得出，异补骨脂素与混合给药组小鼠 LD₅₀ 显著低于补骨脂素 ($P < 0.05, 0.01$)。结果见表 2。

表 1 补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂素和异补骨脂素 (1:1) 混合给药后不同时间小鼠体质量

Table 1 Body weight of mice at different times after administration of psoralen, isopsoralen, and psoralen combined with isopsoralen (1:1)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量/g			
		给药后 1 d	给药后 3 d	给药后 7 d	给药后 14 d
助溶剂	—	22.58±1.89	21.95±1.34	24.03±1.62	26.68±2.81
补骨脂素	1125	21.39±0.78	—	—	—
	843	20.96±0.84	20.30±2.82	23.90±1.98	25.15±4.73
	633	21.16±1.03	22.08±2.03	25.90±2.70	28.92±4.70
	475	21.01±1.02	21.91±2.03	25.04±2.15	27.52±4.22
异补骨脂素	475	21.4±0.83	15.97±1.53	17.45±1.20	21.10±1.13
	404	20.95±0.90	16.30	16.70	21.00
	343	21.09±1.09	16.99±1.38	18.8±1.75	22.18±4.04
	292	21.27±1.10	16.58±1.14	18.51±0.87	21.28±3.03
补骨脂素和异补骨脂素 (1:1) 混合	633	20.23±1.00	—	—	—
	538	19.03±0.98	20.40	19.50	21.80
	457	19.58±0.70	20.90±0.94	21.90±1.40	25.25±3.87
	389	20.74±1.72	20.99±1.42	19.83±1.27	23.53±1.91
	330	20.72±1.22	20.90±1.38	20.11±2.00	23.75±1.53

表 2 补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂素和异补骨脂素 (1:1) 混合 ig 给药 LD₅₀

Table 2 LD₅₀ values of psoralen, isopsoralen, and psoralen combined with isopsoralen (1:1) ig administration

补骨脂素/(mg·kg ⁻¹)	n	死亡数					死亡率/%	LD ₅₀ 及 95%可信限/(mg·kg ⁻¹)			
		1 d	2 d	3 d	4~14 d	总计					
1125	10	1	5	4	0	10	100				
843	10	0	4	4	0	8	80	638.69			
633	10	0	1	2	0	3	30	(526.91~785.78)			
475	10	0	1	2	0	3	30				
异补骨脂素/(mg·kg ⁻¹)	n	死亡数							死亡率/%	LD ₅₀ 及 95%可信限/(mg·kg ⁻¹)	
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7~14d			
475	10	3	80	0	0	0	1	0	8	80	
404	10	3	90	2	0	0	0	0	9	90	351.72**
343	10	0	40	1	0	1	1	0	4	40	(248.17~394.57)
292	10	0	30	0	0	2	1	0	3	30	
补骨脂素和异补骨脂素 (1:1) 混合/(mg·kg ⁻¹)	n	死亡数				死亡率/%	LD ₅₀ 及 95%可信限/(mg·kg ⁻¹)				
		1 d	2 d	3 d	4~14 d						
633	10	1	8	1	0	10	100				
538	10	0	8	1	0	9	90	454.66*			
457	10	0	4	2	0	6	60	(422.58~489.59)			
389	10	0	0	1	0	1	10				
330	10	0	0	0	0	0	0				

与补骨脂素组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs psoralen group

以给药剂量为横坐标, 给药后小鼠死亡率为纵坐标, 分别作出补骨脂素、异补骨脂素及混合用药的量效曲线关系, 可见混合给药的斜率最大, 而补骨脂素的斜率最小 (见图 1)。

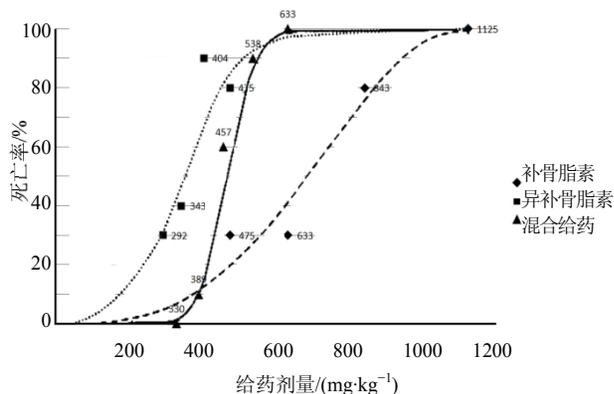


图 1 补骨脂素、异补骨脂素和混合给药量效曲线

Fig. 1 Dose - response curve of psoralen, isopsoralen, and mixed administration

3.2 等效线法分析补骨脂素和异补骨脂素的相互作用

以补骨脂素的 LD₅₀ 为纵截距, 异补骨脂素的 LD₅₀ 为横截距, 连接两点, 做补骨脂素与异补骨脂素的相加等效线。补骨脂素和异补骨脂素 (1:1) 混合 LD₅₀ 坐标点位于两药相加等效线上, 提示补骨脂素和异补骨脂素具有相加作用, 其混合使用等于各自单用的效价之和。见图 2。

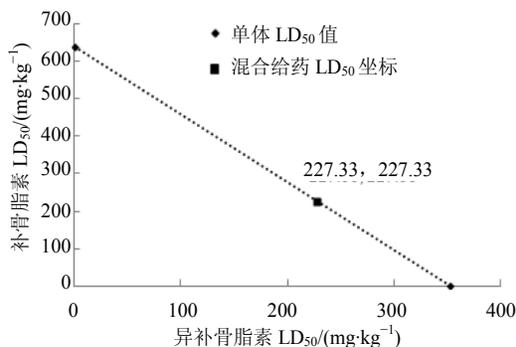


图 2 补骨脂素和异补骨脂素的等效线图

Fig. 2 Equivalent plot of psoralen and isopsoralen

4 讨论

本实验表明, 助溶剂黄芩树胶对小鼠无明显急性毒性, 实验中单独和混合给药产生的毒性都来源于为受试药物毒性体现。补骨脂素和异补骨脂素给药后, 小鼠出现僵直、腹部贴地、活动力减弱, 甚至抽搐、口眼周有分泌物, 心率减慢直至死亡的现象,

说明药物急性毒性可能与循环系统毒性有关。实验发现, 补骨脂素所导致的死亡均在给药后 3 d 内出现, 而给予异补骨脂素的小鼠, 不论是高、低剂量中均有部分小鼠死亡于药后 4~6 d, 尤其是 292 mg/kg 剂量组死亡小鼠全部在药后 4~6 d, 提示异补骨脂素导致的小鼠死亡除循环系统毒性因素外, 很可能与脏器的实质性病变有关。

通过补骨脂素、异补骨脂素的量效曲线方程计算得出, 补骨脂素的 LD₅₀ 为 638.69 mg/kg、LD₁ 为 294.94 mg/kg, 异补骨脂素 LD₅₀ 为 351.72 mg/kg、LD₁ 为 175.73 mg/kg。结果提示, 异补骨脂素的急性毒性明显强于补骨脂素, 其 LD₅₀ 和 LD₁ 均明显低于补骨脂素, 急性毒性强度约为补骨脂素的 1.81 倍 (以 LD₅₀ 比值计算)。值得注意的是, 补骨脂素和异补骨脂素 1:1 混合使用后, 量效曲线斜率与异补骨脂素相近、但呈增大趋势。混合使用的 LD₅₀ 为 454.66 mg/kg (为异补骨脂素的 1.29 倍)、LD₁ 为 337.64 mg/kg (为异补骨脂素的 1.92 倍)。药物在临床的毒副作用表现是由其最小毒性剂量和最小致死剂量体现的, 在临床的实际应用中, 最小毒性剂量和最小致死剂量的意义要大于 LD₅₀。本研究中可以将 LD₁ 近似为最小致死剂量, 混合使用时最小致死剂量为 337.64 mg/kg、其中异补骨脂素为 168.82 mg/kg, 与异补骨脂素单独使用时的最小致死剂量 175.73 mg/kg 仅相差 3.9%, 无明显差别, 因此补骨脂素和异补骨脂素 (1:1) 混合使用相对于异补骨脂素单独使用来说, 其毒性并无显著升高。

补骨脂药材中补骨脂素与异补骨脂素的含量相近^[17-19], 且研究表明^[20], 补骨脂素与异补骨脂素在大鼠体内生物利用度相当。因此实验中将补骨脂素与异补骨脂素的给药剂量比设置为 1:1, 实验结果可以一定程度反映补骨脂中补骨脂素和异补骨脂素的情况。结果表明, 补骨脂药材中同时含有补骨脂素和异补骨脂素时的急性毒性并不高于只含有异补骨脂素, 但由于没有进行两个受试药不同比例的急性毒性研究, 尚不能推断其它比例下的情况。而补骨脂素和异补骨脂素均有明显的药效作用, 如治疗白癜风、银屑病^[4], 这提示在补骨脂的提取工艺中没有必要刻意分离两种成分, 两种成分同时存在可以充分发挥药效作用而且毒性并不会明显高于只含有一种成分。

《中国药典》中规定补骨脂药材人体使用量上限为 10 g/d, 并要求补骨脂素和异补骨脂的总含量不

低于 0.7%，即补骨脂素和异补骨脂素在临床使用量约 70 mg/d，按体表面积折合小鼠用量约 6.3 mg/kg。研究显示^[14, 19]，补骨脂中大量含有的补骨脂苷和异补骨脂苷（约 3%）可在体内相应转化为补骨脂素和异补骨脂素。因此，实际使用补骨脂时相当于使用更高剂量的补骨脂素和异补骨脂素，如果转化比例可以达到 1:1，则相当于补骨脂素和异补骨脂素使用剂量不超过 63 mg/kg，而这个剂量在最小致死剂量（337.64 mg/kg）的 1/6~1/5。

补骨脂素和异补骨脂素大剂量给予小鼠时，引起药物急性毒性反应；其中补骨脂素毒性反应可能与循环系统毒性有关，异补骨脂素毒性反应还可能与脏器的实质性病变有关，两者 1:1 混合呈相加作用。两个受试成分更多比例混合的急性毒性研究、长期用药时的慢性毒性还需进一步研究。

参考文献

- [1] Chopra B, Dhingra A K, Dhar K L. *Psoralea corylifolia* L. (Buguchi) - folklore to modern evidence: review [J]. *Fitoterapia*, 2013, 90: 44-56
- [2] 张红莲, 王雅楠, 王建华. 补骨脂的化学成分及药理活性研究概况 [J]. *天然产物研究与开发*, 2010, 5: 909-913, 918.
- [3] 罗娟敏, 肖雪, 洪流, 等. HPLC/TOF-MS 和 HPLC/IT-MSⁿ 联合用于补骨脂药材的化学成分分析 [J]. *中草药*, 2014, 45(7): 924-928.
- [4] Stern R S. Psoralen and ultraviolet a light therapy for psoriasis [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(7): 682-690.
- [5] 寿清耀, 杨荣平, 王宾豪, 等. 补骨脂雌激素样作用的有效成分研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2007, 6: 425-427.
- [6] Wang D W, Li F M, Jiang Z. Osteoblastic proliferation stimulating activity of *Psoraleae corylifolia* extracts and two of its flavonoids [J]. *Planta Med*, 2010, 67(8): 748-749.
- [7] Li W D, Yan C P, Wu Y, et al. Osteoblasts proliferation and differentiation stimulating activities of the main components of *Fructus Psoraleae corylifoliae* [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(4): 400-405.
- [8] Lim S H, Ha T Y, Kim S R, et al. Ethanol extract of *Psoralea corylifolia* L. and its main constituent, bakuchiol, reduce bone loss in ovariectomised Sprague-Dawley rats [J]. *Brit J Nutr*, 2009, 101(7): 1031.
- [9] 韦妍妍, 张紫佳, 徐颖, 等. 补骨脂对去卵巢大鼠雌激素样作用研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(13): 158-161.
- [10] Xin D, Wang H, Yang J, et al. Phytoestrogens from *Psoraleae corylifoliae* reveal estrogen receptor - subtype selectivity [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(2): 126-131.
- [11] 郭江宁, 吴侯, 翁新楚, 等. 补骨脂中活性成分的提取分离与抗癌实验研究 [J]. *中药材*, 2003, 3: 185-187.
- [12] 周昆, 代志, 柳占彪, 等. 补骨脂水提物引起的大鼠肝损害 [J]. *天津中医药大学学报*, 2013, 4: 221-224.
- [13] Qiao C F, Han Q B, Song J Z, et al. Quality assessment of *Fructus psoraleae* [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2006, 54(6): 887-890.
- [14] Wang Y F, Liu Y N, Xiong W, et al. A UPLC-MS/MS method for *in vivo* and *in vitro* pharmacokinetic studies of psoralen, isopsoralen, psoralen and isopsoralen from *Psoralea corylifolia* extract [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 151(1): 609-617
- [15] 张凌, 张马忠, 杭燕南, 等. 等效线图解法在药效学相互作用研究中的应用 [J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2007, 28(5): 472-476.
- [16] 刘昌孝, 孙瑞元. 药物评价实验统计与统计学基础 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1999: 84-89.
- [17] 许勇, 李乐道, 熊志立, 等. 高效液相色谱法测定中药材补骨脂中补骨脂素和异补骨脂素的含量 [J]. *色谱*, 2003, 21(4): 385-387.
- [18] 陶益, 蒋妍慧, 李伟东, 等. 炮制对补骨脂中 12 种化学成分含量的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(21): 6-9.
- [19] 宋潇, 戚爱棣, 王跃飞, 等. 不同炮制方法对补骨脂中 4 类化学成分的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(15): 2071-2075
- [20] Feng L, Wang L, and Jiang X H. Pharmacokinetics, tissue distribution and excretion of coumarin components from *Psoralea Corylifolia* L. in rat [J]. *Arch Pharm Res*, 2010, 33(2): 225-230.