

【安全性评价】

何首乌醇提物对大鼠的肝毒性研究

李 勇¹, 曾菊芳¹, 杨 娜¹, 牛丽红¹, 陈祥燕¹, 谢晓娟¹, 余晓君¹, 曾 南^{2*}

1. 四川省医学科学院·四川省人民医院实验动物研究所, 四川 成都 610212

2. 成都中医药大学 药学院, 四川 成都 611137

摘 要: **目的** 观察何首乌醇提物对大鼠肝脏的毒性作用, 并探讨其可能的毒性机制。**方法** SD大鼠连续6周ig给予生、制何首乌醇提物(10、20 g生药/kg), 观察动物一般状况、体质量变化; 给药结束时检测血清生化指标, 测定肝脏质量并计算肝脏系数, 进行肝脏组织病理学检查; 提取肝脏线粒体测定呼吸链复合物I活性, 透射电镜观察肝脏线粒体结构。**结果** 生、制何首乌醇提物连续ig给药6周可导致大鼠出现腹泻、体质量增长缓慢等表现; 对丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)等生化指标和肝脏系数无明显影响; 使大鼠肝脏出现轻度炎细胞浸润、肝细胞片状坏死、纤维增生、空泡等组织病理学变化; 能降低大鼠肝脏线粒体呼吸链复合物I活性, 透射电镜下可见个别线粒体嵴紊乱、断裂或消失, 出现空泡。**结论** 生、制何首乌醇提物均可引起大鼠肝脏一定程度的损伤, 其肝毒性机制可能与影响肝脏线粒体的结构和电子传递链功能有关。

关键词: 何首乌醇提物; 大鼠; 肝毒性; 机制; 线粒体

中图分类号: R992

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2019)07-1318-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.07.011

Study on hepatotoxicity of alcohol extracts of *Polygoni multiflorum* in ratsLI Yong¹, ZENG Jufang¹, YANG Na¹, NIU Lihong¹, CHEN Xiangyan¹, XIE Xiaojuan¹, YU Xiaojun¹, ZENG Nan²

1. Institute of Laboratory Animal Sciences, Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610212, China

2. Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China

Abstract: **Objective** To observe the hepatotoxicity of alcohol extracts of *Polygonum multiflorum* in rats, and to further study the possible mechanisms of hepatotoxicity. **Methods** SD rats were given alcohol extracts of raw or processed *Polygonum multiflorum* (10, 20 g/kg) for 6 weeks, the general conditions of rats and body weight were observed. At study termination, the serum level of biochemical indexes were detected, the liver coefficient was calculated, and light microscopic observations of liver were conducted. At the same time, the activity of liver mitochondrial respiratory chain complex I was measured and the structure of liver mitochondrion was observed by transmission electron microscope. **Results** Alcohol extracts of raw and processed *Polygonum multiflorum* both could induce diarrhea in rats and inhibit growth of rats, but biochemical indexes and liver coefficient showed no obvious changes. Mild inflammation cells infiltration, laminar necrosis of liver cells, fibroplasia and vacuoles were observed under light microscope. Compared with the control group, the activity of liver mitochondrial respiratory chain complex I was decreased. Disruption or disappearance of mitochondrial crista were observed under transmission electron microscope. **Conclusion** Alcohol extracts of raw and processed *Polygonum multiflorum* both could induce hepatotoxicity in rats to some degree, impairment of liver mitochondrial structure and mitochondrial respiratory chain function may be one of the mechanisms.

Key words: alcohol extracts of *Polygonum multiflorum*; rats; hepatotoxicity; mechanism; mitochondrion何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根。何首乌生品能解

收稿日期: 2019-01-18

基金项目: 2017年四川省省级科研院所基本科研业务费

第一作者: 李 勇(1975—), 男, 副研究员, 研究方向为药物非临床安全性评价。E-mail: tennisl@163.com

*通信作者: 曾 南, 教授。E-mail: zengnan966@126.com

毒、消痈、截疟,润肠通便。何首乌制品长于补肝肾、益精血、乌须发、强筋骨、化浊降脂^[1],临床常用于治疗肝肾精血亏虚所致眩晕耳鸣、须发早白、腰膝酸软等。然而,近年来有关何首乌不良反应尤其是肝损伤方面的报道日渐增多,引起国内外学者的高度关注。我国国家药品不良反应监测中心收集到的何首乌及其制剂的不良报告(以肝损伤为主)近万份,美国国家医学图书馆发布的LiverTox肝毒性药物数据库对何首乌亦进行了专题记录^[2-5]。基于何首乌肝损伤的报道,本实验主要通过给SD大鼠连续6周ig生、制何首乌醇提物来考察其肝毒性,并进一步从肝脏线粒体形态和功能的角度研究其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 药物

生、制何首乌饮片购自四川千方中药饮片有限公司,产地为四川,批号为16050277(生)、16070167(制),经成都中医药大学严铸云教授鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根。制何首乌为黑豆汁制(按《中国药典》2015年版一部)。

取何首乌饮片适当粉碎,加入8倍量50%乙醇冷浸提取,共提取2次,每次48 h,合并提取液,减压浓缩,回收乙醇,得到浓度为4 g生药/mL的浸膏。给药前取部分浸膏用纯化水稀释至2 g生药/mL。

1.2 动物

SPF级SD大鼠,40只,雄性,体质量200~230 g,购自四川省医学科学院·四川省人民医院实验动物研究所,许可证号:SCXK(川)2013-15。动物饲养于屏障系统中[使用许可证号:SYXK(川)2013-058],温度20~26℃,相对湿度40%~70%,昼夜明暗交替时间12 h/12 h。大小鼠全价颗粒维持饲料由四川省医学科学院·四川省人民医院实验动物研究所提供,生产许可证号:SCXK(川)2015-01,符合中华人民共和国国家标准GB14924.3-2010。饮用水为自来水经高温高压消毒,自由饮用。垫料为玉米芯,⁶⁰Co辐照消毒,由四川省医学科学院·四川省人民医院实验动物研究所提供。

1.3 试剂与仪器

组织线粒体分离试剂盒(批号110317171213)、Bradford蛋白浓度测定试剂盒(批号053117171218),购自上海碧云天生物技术有限公司;GENMED线粒体呼吸链复合物I活性比色法定量检测试剂盒(批号1-423517-14),购自上海杰美基

因医药科技有限公司;ALT、AST、ALP、TBIL检测试剂盒均购自深圳迈瑞生物医疗电子有限公司。

RE-201D型旋转蒸发器(巩义市宇翔仪器有限公司),BS-420型全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司),SDPTOP-722型可见分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司),LEGEND MICRO 17R高速冷冻离心机(Thermo Scientific公司),-80℃医用低温保存箱(青岛海尔),H-600IV型透射电子显微镜(日本日立公司),Ultracut E超薄切片机(Reichert-Jung公司)。

1.4 方法

1.4.1 分组与给药 大鼠称体质量后随机分为5组,即对照组(给予纯化水),生何首乌低、高剂量组(10、20 g生药/kg),制何首乌低、高剂量组(10、20 g生药/kg),每组8只,给药体积为5 mL/kg,1次/d,连续6周。

1.4.2 一般状况观察 每日观察动物外观被毛、行为活动、呼吸、粪便性状等,前4周每周测体质量2次,后两周每周测体质量1次。

1.4.3 血液生化检测 末次给药后,动物禁食不禁水过夜,ip水合氯醛(7%,5 mL/kg)麻醉后,腹主动脉采血约5 mL,3 000 r/min离心分离血清,测定丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)等指标。

1.4.4 脏器系数 末次给药后次日,动物麻醉,采血后放血处死,剖取肝脏并称质量,计算脏器系数(脏器质量/体质量×100)。

1.4.5 组织病理学检查 肝脏用10%中性缓冲福尔马林溶液固定,经梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片,常规HE染色,光镜下观察肝脏的组织病理学变化。

1.4.6 透射电镜检查 取新鲜肝组织,切成1 mm×1 mm×1 mm大小,3%戊二醛固定,1%四氧化锇固定,丙酮逐级脱水,Epon812渗透、包埋,半薄切片光学定位,超薄切片,切片厚约50 nm,捞于铜网上,醋酸铀及枸橼酸铅双重染色,日立H-600IV型透射电镜观察。

1.4.7 线粒体呼吸链复合物I活性测定 剪取新鲜肝脏组织约200 mg,采用组织线粒体分离试剂盒按差速离心法提取线粒体,Bradford蛋白浓度测定试剂盒对线粒体总蛋白进行测定。按线粒体呼吸链复合物I活性检测试剂盒说明测定复合物I的活性。

1.5 统计学处理

采用SPSS18.0软件进行统计学处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差(ANOVA)

分析。

2 结果

2.1 一般状况观察

给药组动物在给药后均出现流涎、软便、肛周污秽等现象,其中生何首乌组比制何首乌组更为明显,高剂量组比低剂量组突出。提示何首乌炮制后其致泻作用较生品减弱。

2.2 对大鼠体重变化的影响

从给药第11天开始,给药组动物体重增长低于对照组,其中制何首乌低剂量组大鼠的体重增长要好于生何首乌低、高剂量组及制何首乌高剂量组,但各组间无显著差异。结果表明,何首乌醇提取物连续服用可抑制大鼠体重增长,且生品作用强于制品。结果见图1。

2.3 对大鼠血清生化指标的影响

与对照组比较,各给药组 ALT、AST、ALP 没有明显升高, TBIL 有明显下降($P<0.01$),但均在正常生理范围,认为无毒理学意义。结果见表1。

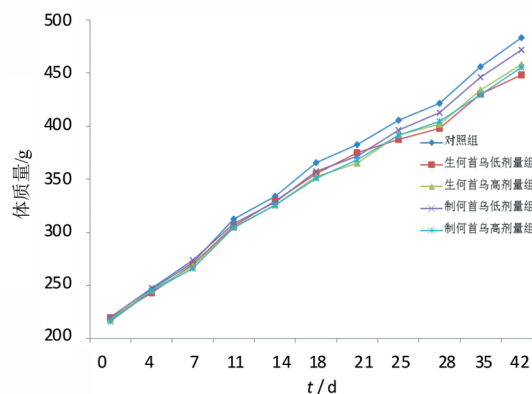


图1 何首乌醇提取物连续给药6周对大鼠体质量的影响
Fig. 1 Effect of alcohol extracts of *Polygonum multiflorum* on body weight of rats in 6 weeks administration

2.4 对大鼠肝脏质量/系数的影响

与对照组比较,各给药组对大鼠肝脏质量及脏器系数无明显影响。结果见表2。

表1 何首乌醇提取物连续给药6周对大鼠血液生化指标的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effect of alcohol extracts of *Polygonum multiflorum* on the serum biochemical indicators in rats after 6 weeks administration ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(g生药·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	ALP/(U·L ⁻¹)	TBIL/(μmol·L ⁻¹)
对照	—	25.6±4.0	87.0±16.6	127.2±26.5	1.9±0.2
生何首乌	10	25.8±4.7	82.6±15.6	129.7±18.1	0.7±0.2**
	20	31.5±6.6	91.0±20.9	123.3±26.1	0.4±0.1**
制何首乌	10	25.6±4.4	92.4±12.5	127.5±36.0	1.2±0.3**
	20	27.2±6.2	98.1±14.5	124.2±30.8	0.9±0.3**

与对照组比较:** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group

表2 何首乌醇提取物连续给药6周对大鼠肝脏质量及系数的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effect of alcohol extracts of *Polygonum multiflorum* on absolute and relative weight of liver in rats after 6 weeks administration ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(g生药·kg ⁻¹)	体质量/g	肝脏质量/g	肝脏系数/(g·100g ⁻¹)
对照	—	483.0±31.1	11.510±1.448	2.376±0.185
生何首乌	10	448.0±23.4	10.150±0.641	2.266±0.091
	20	457.9±19.5	10.502±0.551	2.294±0.087
制何首乌	10	471.7±22.8	11.010±0.858	2.333±0.116
	20	455.6±32.9	10.527±0.608	2.317±0.157

2.5 大鼠肝脏组织病理学检查

病理切片 HE 染色可见,对照组大鼠肝脏门管区结构清楚,肝细胞索排列整齐,形态正常。生何首乌低剂量组大鼠肝脏可见轻度炎细胞浸润和纤维增生;高剂量组可见轻度的炎细胞浸润、肝细胞

片状坏死、纤维增生和空泡变性等。制何首乌低剂量组大鼠肝脏可见轻度的炎细胞浸润、肝细胞片状坏死和空泡变性等;高剂量组可见轻度的炎细胞浸润、肝细胞肿大及片状坏死、纤维增生等。结果见图2。

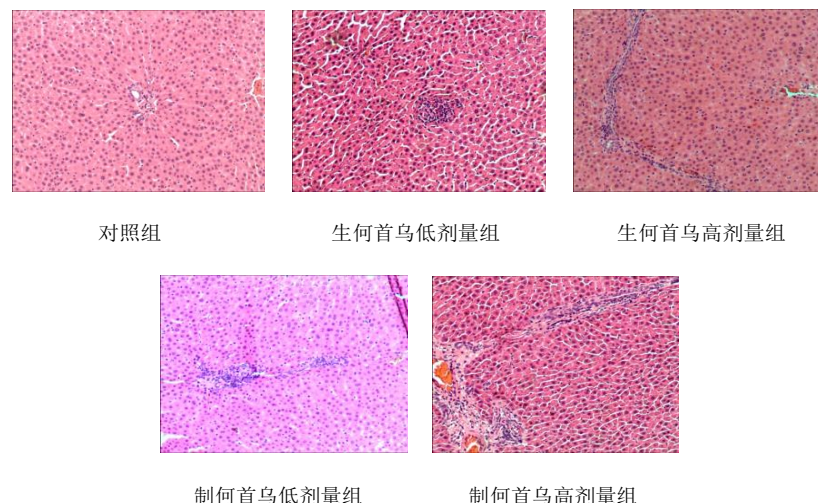


图2 何首乌醇提取物连续给药6周大鼠肝脏组织病理切片($\times 100$)

Fig.2 Effect of alcohol extracts of *Polygonum multiflorum* on histological changes of rat liver after 6 weeks administration($\times 100$)

2.6 透射电镜检查

对照组大鼠肝细胞内线粒体丰富,线粒体嵴正常,未见空泡出现,细胞核形状规则,染色质分布均匀,内质网形态结构正常,未见扩张。生何首乌醇提取物低剂量组胞内线粒体丰富,线粒体嵴正常,未见空泡出现,而高剂量组胞内线粒体丰富,个别线粒体嵴可见,也有个别线粒体形状正常,但嵴紊乱或者消失,核内陷,胞内有脂滴出现。制何首乌醇

提取物低剂量组细胞核形状规则,染色质分布均匀,胞内线粒体丰富,形态规则,未见明显空泡,内质网形态结构正常,而高剂量组胞内线粒体丰富,个别线粒体嵴可见,也有个别线粒体嵴断裂,消失,出现空泡,有脂滴出现。结果提示,生、制何首乌醇提取物高剂量组大鼠的肝脏线粒体结构表现出一定程度的损伤。结果见图3。

2.7 对线粒体呼吸链复合物I活性的影响

与对照组比较,给药组线粒体呼吸链复合物I活

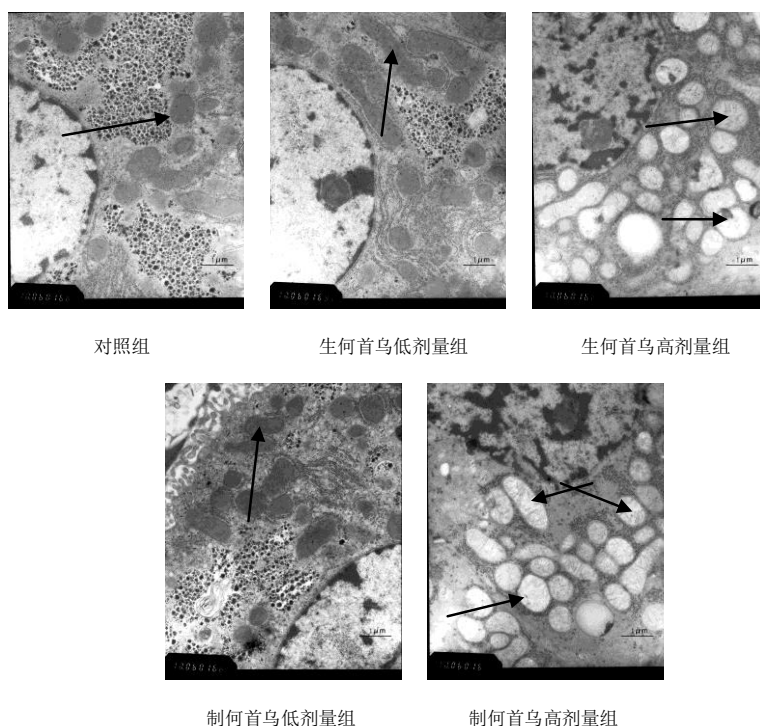


图3 何首乌醇提取物连续给药6周大鼠肝脏透射电镜观察结果($\times 10\ 000$)

Fig. 3 Effect of alcohol extracts of *Polygonum multiflorum* on transmission electron microscope observation of rat liver after six weeks administration($\times 10\ 000$)

性降低,其中生、制何首乌醇提物高剂量组降低作用显著($P<0.05$)。结果见表3。

表3 何首乌醇提物连续给药6周对大鼠肝组织线粒体呼吸链复合物I活性的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Effect of alcohol extracts of *Polygonum multiflorum* on the activity of mitochondrial respiratory chain complex I of rat liver after 6 weeks administration($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(g生药· kg ⁻¹)	COXI/(nmol·min ⁻¹ · mg ⁻¹ protein)
对照	—	34.95±16.00
生何首乌	10	21.51±9.96
	20	18.82±11.13*
制何首乌	10	21.51±11.50
	20	17.47±8.00*

与对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group

3 讨论

何首乌始载于《开宝本草》,为传统补益中药,作为“四大仙草(人参、灵芝、冬虫夏草、何首乌)”之一,为古今医家、饮食家所推崇,称为滋补延年佳品。历代本草著作鲜有述及何首乌的安全性问题,传统认为是无毒中药。但现代研究发现含有何首乌的中成药、何首乌饮片生品和炮制品等均会引起肝损伤^[4,6],生何首乌毒性大于制何首乌,何首乌醇提物毒性大于水提物^[7-9]。

本实验观察到生何首乌醇提物连续给药6周,大鼠表现出的腹泻、体质量增长抑制等均较制何首乌醇提物明显,提示生品较制品的一般毒性更大,传统的炮制方法能一定程度上降低生何首乌的毒性。生、制何首乌醇提物对大鼠血清ALT和AST水平、肝脏质量及系数的影响不明显,肝脏组织病理学也仅见散在的轻度的改变,并未发现与给药相关的严重的病变,提示大剂量何首乌醇提物连续给药6周尚未引起大鼠明显的、广泛的肝损伤。有文献报道^[8,10]何首乌并未引起大鼠血清ALT和AST显著升高,本实验结果也提示ALT和AST并不能敏感地评价和预测何首乌肝损伤,尚需进一步研究寻找和验证更敏感、更特异的生物标志物。目前关于何首乌肝毒性的报道各研究小组的结果并不完全一致,可能与药材来源、化学成分含量、给药剂量、动物模型等均有关,动物实验多是在正常动物、大剂量长期给药情况下才出现肝毒性,与临床用药不

太相符,但对于寻找药物毒性物质基础、研究毒性作用机制仍有积极意义。

何首乌所含化学成分较多,包括二苯乙烯苷类、蒽醌类、磷脂类、鞣质等^[11-12],虽然何首乌致肝损伤作用确切,但其毒性物质基础及作用机制尚不完全清楚。多数研究认为何首乌的毒性物质基础是蒽醌类物质,如大黄素、大黄酸等^[13-14],但亦有研究认为鞣质、二苯乙烯苷同样具有肝毒性^[15-16]。究其肝毒性的作用机制则有多种提法,如直接损伤肝细胞或亚细胞成分,对肝药酶抑制或诱导,免疫性损伤等^[17-18]。近年来越来越多的研究表明,线粒体损伤是许多药物毒性作用的重要特征,并提示线粒体是药物毒性作用的重要靶标。任何通过直接或间接作用而破坏线粒体结构和功能的药物均可导致线粒体毒性,并有可能引起严重的靶器官毒性^[19]。与氧化磷酸化有关的酶位于线粒体内膜上,即呼吸链复合物(MRC),呼吸链复合物I是NADH进入电子传递链的入口。肝细胞呼吸链复合物活性降低,必将影响电子传递进程,导致肝细胞的能量代谢障碍,进而影响肝脏正常的生理功能^[20]。

本实验通过透射电镜观察到生、制何首乌醇提物高剂量组大鼠有肝脏线粒体嵴断裂、紊乱或消失,出现空泡,胞浆出现脂滴等表现,且大鼠肝脏线粒体呼吸链复合物I活性亦下降。结果提示何首乌对线粒体结构和功能的影响可能是其致肝毒性的机制之一,但仍需进一步深入的研究。

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2015.
- [2] Mazzanti G, Battinelli L, Daniele C, et al. New case of acute hepatitis following the consumption of Shou Wu Pian, a Chinese herbal product derived from *Polygonum multiflorum* [J]. Ann Intern Med, 2004, 140(7): W30.
- [3] Lei X, Chen J, Ren J, et al. Liver damage associated with *Polygonum multiflorum* Thunb.: A systematic review of case reports and case series [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 2015: 459749.
- [4] 孙震晓, 张 力. 何首乌及其制剂相关肝损害国内文献回顾与分析 [J]. 药物不良反应杂志, 2010, 12(1): 26-30.
- [5] Hoofnagle J H, Serrano J, Knoben J E, et al. LiverTox: a website on drug-induced liver injury [J]. Hepatology, 2013, 57(3): 873-874.
- [6] 陈盛君. 何首乌肝损伤不良反应信息分析及其毒性机制研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(7): 573-577.
- [7] 涂 灿, 蒋冰倩, 赵艳玲, 等. 何首乌炮制前后对大鼠肝脏的损伤比较及敏感指标筛选 [J]. 中国中药杂志,

- 2015, 40(4): 654-660.
- [8] 李 奇, 赵奎君, 赵艳玲, 等. 大剂量何首乌醇提物致大鼠多脏器损伤研究 [J]. 环球中医药, 2013, 6(1): 1-7.
- [9] 李晓菲, 李 娜, 涂 灿, 等. 基于内毒素特异质模型的生首乌与制首乌肝毒性比较研究 [J]. 中草药, 2015, 46(10): 1481-1486.
- [10] 王 涛, 王佳颖, 江振洲, 等. 何首乌水提物大鼠连续灌胃给药 28d 肝毒性研究——胆汁淤积相关性分析 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(10): 1445-1450.
- [11] 龚彦胜, 张亚囡, 黄 伟, 等. 与功效毒性相关的何首乌化学成分研究进展 [J]. 中国药物警戒, 2012, 9(8): 472-475.
- [12] 高淑红, 苏珍枝, 肖学凤. 制首乌化学成分及药理作用研究进展 [J]. 山西中医学院学报, 2012, 13(2): 74-77.
- [13] 宋 婧, 马致洁, 王伽伯, 等. 何首乌及其主要成分对正常人 L02 肝细胞损伤作用的研究 [J]. 北京中医药, 2016, 35(7): 694-697.
- [14] 张瑞晨, 刘 斌, 孙震晓. 何首乌提取物对人正常肝细胞 L02 周期阻滞及凋亡的影响 [J]. 中西医结合学报, 2010, 8(6): 554.
- [15] 胡锡琴, 李娅琳, 王 磊. 何首乌中鞣质对大鼠肝脏生化指标的影响 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(1): 63-65.
- [16] 胡锡琴, 嵯 君, 李娅琳, 等. 何首乌中二苯乙烯苷对大鼠肝酶及蛋白的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(5): 988-990.
- [17] 李 奇, 赵奎君. 何首乌的肝毒性研究进展 [J]. 国际中医中药杂志, 2012, 34(8): 747-750.
- [18] 方文君, 谭兴起, 胡永胜, 等. 中药何首乌肝毒性物质基础及其毒性机制研究 [J]. 海峡药学, 2015, 27(6): 41-43.
- [19] Dykens J A, Will Y. The significance of mitochondrial toxicity testing in drug development [J]. Drug Discov Today, 2007, 12(17-18): 777-785.
- [20] 耿广琴, 杨志军, 杨秀娟, 等. 黄芩水煎液对 CCL₄ 肝损伤小鼠肝线粒体的影响 [J]. 中国中医药科技, 2015, 22(6): 641-643.