

蜚螂急性毒性研究

马家骅^{1,2}, 蒋巧梅^{2,3}, 谭承佳⁴, 杨明^{2,5}

1. 西南科技大学 生物科学实验中心, 四川 绵阳 621010
2. 成都中医药大学, 四川 成都 611137
3. 四川升和药业股份有限公司, 四川 成都 611130
4. 绵阳师范学院, 四川 绵阳 621000
5. 江西中医学院, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 探讨蜚螂 *Catharsius molossus* 的毒性, 明确蜚螂的毒性成分。方法 采用小鼠急性毒性实验, 研究蜚螂乙醇提取物及其水提取部位的毒性; 采用有机溶剂沉淀与凝胶色谱法分离蜚螂水提取部位的毒性成分。结果 小鼠 ig 给予剂量小于 34.8 g/kg 的蜚螂乙醇提取物, 毒性很小, 表明经口给药安全。蜚螂水提取部位有明显的急性毒性, 主要症状为精神萎靡、呼吸异常、呆卧少动、对外界声刺激反应迟钝等, 蜚螂水提取部位半数致死量 (LD₅₀) 为 19.01 g/kg。蜚螂水提取部位中蛋白质质量分数约 13%, 相对分子质量在 $1.5 \times 10^3 \sim 3.0 \times 10^4$, 其中相对分子质量在 3.0×10^4 左右的蛋白质可能是蜚螂水提取部位毒性成分之一。结论 蜚螂毒性与本草学描述相符。

关键词: 蜚螂; 急性毒性; 蛋白质; 本草学; 氨基酸

中图分类号: R285.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)12-1638-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.12.022

Study on acute toxicity of *Catharsius molossus*

MA Jia-hua^{1,2}, JIANG Qiao-mei^{2,3}, TAN Cheng-jia⁴, YANG Ming^{2,5}

1. Experimental Center of Biological Sciences, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China
2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
3. Sichuan Sunnyhope Pharmaceutical Co., Ltd., Chengdu 611130, China
4. Mianyang Normal University, Mianyang 621000, China
5. Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To study the toxicity of *Catharsius molossus* and the toxic components in *C. molossus*. **Methods** The toxicities of ethanol and water extracts from *C. molossus* were measured by acute toxicity experiments in mice. The toxic components in the water extract of *C. molossus* were isolated by organic solvent precipitation and gel permeation chromatography. **Results** The mice were ig administered with the ethanol extract (≤ 34.8 g/kg), which indicated that the oral administration was safe. The water extract had the significant acute toxicity with the LD₅₀ value of 19.01 g/kg, and the symptoms were listlessness, abnormal breathing, lack of exercise, and unresponsive to external acoustic stimulation. The purified water extract contained 13% of protein, and the molecular weight distributed from 1.5×10^3 to 3.0×10^4 . The protein (molecular weight of 3.0×10^4) may be one of the toxic components of *C. molossus*. **Conclusion** Herbalogical description is consistent with the modern research on the toxicity of *C. molossus*.

Key words: *Catharsius molossus* Linnaeus; acute toxicity; protein; herbalogy; amino acid

蜚螂为金龟子科昆虫蜚螂 *Catharsius molossus* Linnaeus 的干燥虫体, 味咸, 性寒, 有毒, 入肝、胃、大肠经, 具有治疗两便不通的功效。近年来也有文献报道蜚螂单用或合用治小便不通、小便血淋、

膀胱结石、膀胱癌肿等^[1-2]。这些报道提示蜚螂可改善排尿, 用于良性前列腺增生症的治疗。本课题组为揭示蜚螂治疗良性前列腺增生的物质基础进行了大量工作^[3-6]。本实验根据本草著作中“(蜚螂)勿

收稿日期: 2012-10-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30902005); 西南科技大学博士基金资助项目 (10zx7153)

作者简介: 马家骅 (1979—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为中药新制剂与物理药剂学。Tel: (0816)6089531 E-mail: jiahuama@163.com

置水中,令人吐”的描述^[7-9],对蜚螂乙醇提取物及其水部位进行了毒性实验^[10],并对毒性成分进行了初步分离。

1 材料

1.1 药物与试剂

蜚螂药材,购于成都五块石药材市场,经成都中医药大学杨明教授鉴定为 *Catharsius molossus* Linnaeus 的干燥体,符合部颁药材标准。蓝色葡聚糖 2000、葡聚糖凝胶 G-50、葡聚糖凝胶 LH-20, Pharmacia 公司;乙醇为分析纯。

1.2 动物

昆明种小鼠,一级,体质量 18~22 g,雌雄各半,由成都中医药大学实验动物研究中心提供,合格证号:SCXK(川)2004-11。

1.3 仪器

JYL-350 料理机,山东九阳小家电有限公司;RE-52C 型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;日立 835-50 型氨基酸自动分析仪,日本 Hitachi;UV-1700 分光光度计,日本 Shimadzu 公司。

2 方法

2.1 提取物制备

蜚螂药材粗粉加 3 倍量 95%乙醇浸泡 48 h,加 10 倍量乙醇渗漉,回收乙醇,得乙醇提取液(含生药 0.87 g/mL,最大浓缩质量浓度);残渣加水搅拌提取 2 次,每次 12 h,提取液滤过,回收溶剂,浓缩,得水提取部位(含生药 1.60 g/mL,最大浓缩质量浓度)。

2.2 蜚螂乙醇部位急性毒性实验

2.2.1 预试验 小鼠 12 只,雌雄各半,随机分为 2 组,每组 6 只,分别 ig 给予蜚螂乙醇提取物 34.8、17.4 g/kg(按小鼠日内最大给药量 0.4~0.8 mL/只折算) 1 次,结果 2 组均未引起小鼠死亡,故不进行半数致死量(LD₅₀)测定。

2.2.2 最大耐受量测定 取小鼠 40 只,雌雄各半,随机分为对照组和给药组 2 组,每组 20 只,分别 ig 给予纯水和蜚螂乙醇提取物 1 次,给药剂量为 34.8 g/kg,给药后常规饲养 14 d。

2.2.3 观察指标 观察给药 14 d 期间小鼠毛色、四肢活动、进食、饮水、粪便等情况,有无明显中毒症状及死亡情况,并对重要脏器进行肉眼观察,看有无水肿、充血等。

2.3 蜚螂水提取部位急性毒性实验

2.3.1 预试验 小鼠 12 只,雌雄各半,随机分为 2

组,每组 6 只,分别 ig 给予蜚螂水提取部位 64.0、32.0 g/kg(按小鼠日内最大给药量 1.60 g/mL 折算) 1 次,结果 2 组小鼠均有死亡,故进行小鼠 0、100% 死亡剂量和 LD₅₀ 测定。

2.3.2 小鼠 0 和 100%死亡给药剂量的确定 小鼠 24 只,雌雄各半,随机分为 6 组,每组 4 只,各组按一定剂量(32.0~12.0 g/kg) ig 给药,确定小鼠 0 和 100%死亡的剂量范围。

2.3.3 LD₅₀ 确定 取小鼠 80 只,雌雄各半,随机分为 8 组,每组 10 只,分别为对照组,给药 1、2、3、4、5、6、7 组。对照组 ig 纯水,给药组分别 ig 给予不同剂量的蜚螂水提取部位 1 次,给药组组间剂量比值(K)为 0.85,给药量均为 20 mL/kg,给药后小鼠常规饲养 14 d。根据改良寇氏法公式计算 LD₅₀。

$$LD_{50} = \lg^{-1}[X_m - i(\Sigma p - 0.5)]$$

X_m 为最大剂量的对数值, i 为相邻两组剂量之比的对数, Σp 为各组死亡率之和, p 为各组死亡率

2.3.4 观察指标 给药后立即记录小鼠中毒潜伏期、中毒表象、死亡时间、死前现象、死亡数目、系统尸解等情况,并逐日观察小鼠毛色、四肢活动、进食、饮水、粪便等情况,对重要脏器进行肉眼观察,看有无水肿、充血等。

2.4 蜚螂水提取部位成分分析

2.4.1 蜚螂水提取部位蛋白质检测 蜚螂水提取部位含大量蛋白质,因此采用凯氏定氮法^[11]测定蛋白质的量,同时用氨基酸自动分析仪检测游离氨基酸与结合型氨基酸。

2.4.2 蜚螂水提取部位纯化 按“2.1”项下方法制备蜚螂水提取液,浓缩其至含生药 0.5 g/mL,浓缩液加乙醇至含醇量 85%,冰箱中静置 12 h,离心收集沉淀,丙酮洗涤后减压抽干,得蜚螂蛋白粗品。称取蛋白粗品适量配成水溶液,滤过,上葡聚糖凝胶 G-50 或葡聚糖凝胶 LH-20 柱,用蒸馏水洗脱,体积流量 0.5 mL/min,收集洗脱液,稀释后测定 280 nm 处吸光度(A)值,绘制洗脱曲线。

3 结果

3.1 蜚螂乙醇部位急性毒性实验

3.1.1 最大耐受量 小鼠 ig 给予蜚螂乙醇提取物的最大给药剂量为 34.8 g/kg,此剂量为临床成年人最大拟用剂量的 174.0 倍,故可认为蜚螂乙醇提取物对小鼠 ig 给药的急性毒性很小,经口给药安全。

3.1.2 毒性反应 对照组小鼠给药后 14 d 内毛色光

洁, 四肢活动、进食、饮水均正常, 鼻、眼、口无异常分泌物, 粪便正常, 未出现中毒症状及死亡, 重要脏器未见肉眼可见的病理变化。蜈蚣乙醇提取物给药组小鼠在给药后有暂时不适应症状, 表现为给药后第 1 天内活动减少, 摄食和饮水较少, 粪便呈油腻稠膏状, 第 2 天恢复正常, 14 d 内均未出现死亡, 重要脏器未见肉眼可见的病理变化, 体质量增加且与对照组相比无显著差异。

3.2 蜈蚣水提取部位急性毒性实验

3.2.1 小鼠 0 和 100% 死亡给药剂量范围的确定 预试验结果显示, 小鼠 0 和 100% 死亡的剂量范围为 12.0~32.0 g/kg。

3.2.2 LD₅₀ 确定 蜈蚣水提取部位对小鼠的 LD₅₀ 为 19.01 g/kg, 95% 可信限为 21.18~17.06 g/kg。结果见表 1。

表 1 各组 LD₅₀ 测定结果 (n = 10)

Table 1 Results of LD₅₀ of mice in each group (n = 10)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	死亡数 / 只	死亡率 / %
对照	0	0	0
蜈蚣水提取部位	32.0	10	100
	27.2	9	90
	23.1	8	80
	19.7	7	70
	16.7	2	20
	14.2	1	10
	12.0	0	0

3.2.3 毒性反应 蜈蚣水提取部位给药后引起小鼠中毒, 且在整個中毒过程中小鼠均处于抑制状态, 中毒反应表现为精神萎靡, 起初呼吸振幅增大、频率加快, 后来呼吸缓慢, 呆卧少动、无力、弓背、被毛蓬松、闭眼、对外界声刺激反应迟钝、拒食、粪便较清稀, 并在抑制下死亡。最高剂量 (32.0 g/kg) 组小鼠在 2 h 内开始迅速死亡, 个别在 4 h 后死亡, 6 h 内全部死亡; 其余各给药组小鼠死亡时间大多发生在 15 h 内, 未死亡小鼠 24 h 后中毒症状消失, 且再未出现死亡。高剂量组急性死亡小鼠胃底和肠有出血现象, 肠内水肿充血, 但随剂量减小症状减轻, 其他重要脏器未见肉眼可见的病理变化。

3.3 蜈蚣水提取部位成分分析

3.3.1 蜈蚣水提取部位成分测定 蜈蚣水提取部位

粗蛋白质量分数为 21.6%; 总氨基酸质量分数为 20.5%, 游离氨基酸质量分数为 0.988%, 即水提部位含游离氨基酸较少, 主要含蛋白质。氨基酸测定结果见表 2。

表 2 蜈蚣水提取部位中氨基酸分析

Table 2 Analysis on amino acids in aqueous extract from *C. molossus*

氨基酸种类	酸水解氨基酸 / (mg·kg ⁻¹)	游离氨基酸 / (mg·kg ⁻¹)
天门冬氨酸	15.938	0.250
苏氨酸	6.438	0.075
丝氨酸	5.694	0.012
谷氨酸	19.075	0.744
甘氨酸	9.331	0.094
丙氨酸	8.013	0.319
胱氨酸	1.488	0.213
缬氨酸	6.938	0.319
蛋氨酸	2.488	0.144
异亮氨酸	7.394	0.225
亮氨酸	9.213	0.275
酪氨酸	5.006	0.906
苯丙氨酸	6.319	0.738
赖氨酸	10.281	1.638
组氨酸	2.569	0.044
精氨酸	7.225	0.038
脯氨酸	4.813	—
色氨酸	—	—
总量	128.219	6.175

3.3.2 蜈蚣水提取部位凝胶色谱 采用葡聚糖凝胶 G-50 与葡聚糖凝胶 LH-20 柱色谱对蜈蚣水提取液粗蛋白进行分离, 结果发现相对分子质量分布范围较广, 大于 3.0×10^4 和小于 1.5×10^3 及介于二者之间者均有, 对通过葡聚糖凝胶 LH-20 的一个色谱峰 (相对分子质量 $> 4.0 \times 10^3$ 或在 4.0×10^3 左右) 的洗脱液进行合并, 经葡聚糖凝胶 G-50 柱分离, 所得洗脱峰较为单一 (洗脱曲线见图 1), 其相对分子质量约为 3.0×10^4 。

4 讨论

本实验发现, 蜈蚣乙醇提取物 34.8 g/kg ig 给予小鼠是安全的, 表明蜈蚣治疗良性前列腺增生的有效物质可能不易溶于水; 而其水提取部位具有明显的急性毒性, 给药后中毒小鼠主要呈抑制状态, 最

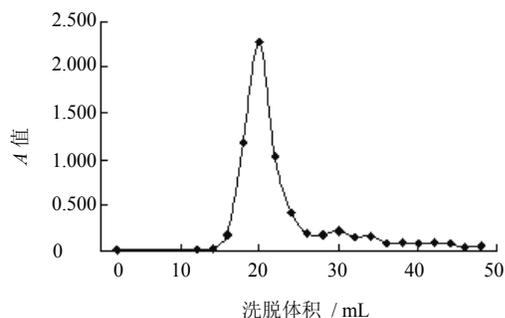


图1 蜚螂水提取部位凝胶洗脱曲线

Fig. 1 Gel elution curve of water extract from *C. molossus*

后致呼吸抑制死亡, LD₅₀为 19.01 g/kg, 这与历代本草中记载的“勿置水中, 令人吐”相吻合。结果还表明, 蜚螂的水提取部位蛋白质相对分子质量大于 3.0×10^4 和小于 1.5×10^3 及介于二者之间者均有, 主要为相对分子质量 $1.5 \times 10^3 \sim 3.0 \times 10^4$ 的蛋白。结合文献报道^[12], 推测相对分子质量在 3.0×10^4 左右的蛋白质可能是蜚螂水提取部位毒性成分之一, 这有待药理实验进一步验证。

《本草纲目》引《杨氏经验方》称蜚螂治大小便不通时特别注明其加工方法为阴干, 《千金要方》亦载其阴干, 《本事方》中记载“蜚螂治疗大小便闭, 推车散: 用推车客七个……新瓦焙, 研末”; 《鲍氏小儿方》与《本草纲目》治疗小便血均载蜚螂研末水冲服。这些本草描述初步表明蜚螂治疗良性前列腺增生的有效物质可能遇热不稳定, 且不易溶于水, 可能为非水溶性蛋白质或多肽类成分。后期研究将在此基础上进一步利用现

代分离、分析技术, 结合相关的药效实验, 揭示中药蜚螂药效物质基础与作用机制。

参考文献

[1] 李结实, 金星, 彭成华, 等. 常德贵教授运用中医药治疗膀胱癌经验 [J]. 中医学报, 2012, 27(2): 172-173.

[2] 张蜀武, 常德贵, 邵继春, 等. 通关胶囊治疗前列腺增生症临床观察及机理探讨 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2001, 7(1): 10-12.

[3] 马家骅, 谭承佳, 韩丽, 等. 泡沫分离用于蜚螂蛋白质类成分分离的实验研究 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1223-1225.

[4] 马家骅, 谭承佳, 衣文娇, 等. 基于有效组分检测与理化表征相结合的蜚螂有效部位制备工艺研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(9): 1123-1126.

[5] 谭承佳, 马家骅, 吴利凌, 等. 蜚螂有效部位的初步表征 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 100-103.

[6] 蒋巧梅, 谭承佳, 马家骅, 等. 蜚螂抗良性前列腺增生症活性部位的筛选 (I) [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(6): 19-22.

[7] 唐慎微. 重修政和经史证类备用本草 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982.

[8] 日华子, 韩保昇. 尚志钧辑. 日华子本草 蜀本草 [M]. 合刊本. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2005.

[9] 张璐. 赵小青, 裴晓峰校注. 本经逢原 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1996.

[10] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.

[11] 中国药典 [S]. 三部. 2005.

[12] 钱锐. 有毒昆虫及昆虫毒素的应用 [J]. 昆虫知识, 1988, 25(5): 305-307.