

## • 药理与临床 •

## 基于肝细胞毒价检测的雷公藤质量评价方法研究

赵庆国<sup>1,3</sup>, 王艳辉<sup>2</sup>, 马致洁<sup>4\*</sup>, 张萍<sup>2</sup>, 赵艳玲<sup>2</sup>, 赵奎君<sup>4</sup>, 格小光<sup>5</sup>, 郝庆秀<sup>5</sup>, 黄璐琦<sup>5</sup>, 王伽伯<sup>2</sup>, 肖小河<sup>2\*</sup>

1. 解放军军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850
2. 解放军第三〇二医院全军中医药研究所, 北京 100039
3. 解放军第三〇二医院 药学部, 北京 100039
4. 首都医科大学附属北京友谊医院, 北京 100050
5. 中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100070

**摘要:** 目的 建立基于肝细胞毒价检测的雷公藤药材质量评价方法。方法 以正常人肝细胞(L02细胞系)为研究载体,以细胞抑制率为检测指标,优化建立肝细胞毒价检测方法,评价不同产地雷公藤及其地方习用品昆明山海棠药材的质量。结果 以对乙酰氨基酚(毒价定义为400 U/g)为阳性对照品,50%乙醇超声提取雷公藤后真空干燥为干膏,用培养基配制生药量3 mg/mL的供试液,稀释比1:0.65,量反应平行线法检测,18份雷公藤样品肝细胞毒价17.78~4 131.4 U/g(相差超过200倍),5份昆明山海棠样品肝细胞毒价209.42~7 422.2 U/g(相差超过30倍),不同产地雷公藤及昆明山海棠药材的肝细胞毒价差异显著;并且所检测样品鲜品较市售干品毒性大。结论 初步建立了基于肝细胞毒价检测的雷公藤质量评价方法,直接关联其临床肝脏毒副反应,对从质量控制角度提高雷公藤临床用药安全具有参考价值,也为雷公藤肝毒性成分筛选提供准确定量的方法。

**关键词:** 雷公藤; 昆明山海棠; 肝毒性; 毒价; 质量控制

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)03-0378-06

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.03.014

Establishment of hepatotoxic bioassay for quality control of *Tripterygium wilfordii*

ZHAO Qing-guo<sup>1,3</sup>, WANG Yan-hui<sup>2</sup>, MA Zhi-jie<sup>4</sup>, ZHANG Ping<sup>2</sup>, ZHAO Yan-ling<sup>2</sup>, ZHAO Kui-jun<sup>4</sup>,  
GE Xiao-guang<sup>5</sup>, HAO Qing-xiu<sup>5</sup>, HUANG Lu-qi<sup>5</sup>, WANG Jia-bo<sup>2</sup>, XIAO Xiao-he<sup>2</sup>

1. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China
2. China Military Institute of Traditional Chinese Medicine, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China
3. Department of Pharmacy, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China
4. Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China
5. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100070, China

**Abstract: Objective** To establish a method suitable to the quality evaluation of the roots in *Tripterygium wilfordii* based on hepatotoxic potency. **Methods** The inhibitory rates of *T. wilfordii* and its regional substitute—*T. hypoglaucomum*, with normal human hepatocytes (L02 cell line) as carrier, were established by optimizing a series of factors, such as test samples prepared with conditions. **Results** Taking *p*-acetaminophen as positive control (toxic potency was 400 U/g). The 50% ethanol extract of *T. wilfordii* was dried under ultrasonic vacuum to obtain the dry paste. The test solution with crude drug of 3 mg/mL was prepared by medium. The dilution ratio was 1:0.65. The hepatotoxic potencies of 18 batches of *T. wilfordii* and 5 batches of *T. hypoglaucomum* were 17.78—4 131.4 and 209.42—7 422.2 U/g, respectively, detected by the reaction parallel line method, and the differences were over 200 and 30 times. There was the significant hepatotoxic potency of *T. wilfordii* and *T. hypoglaucomum* from the various origins. In addition, the fresh

收稿日期: 2014-06-18

基金项目: 国家科技支撑计划课题(2012BAI29B02); 国家公益性行业科研专项(201207002); 中央本级课题(20603020101); 北京市中医药科技发展基金项目(QN2014-18); 首都医科大学附属北京友谊医院启动项目(yyqdk2014-20)

作者简介: 赵庆国,男,主管药师,主要从事药事管理、药剂学研究。Tel/Fax: (010)66933231 E-mail: zhaogq302@163.com

\*通信作者 肖小河,男,研究员,博士生导师,主要从事面向临床的中药标准化研究。Tel/Fax: (010)66933325 E-mail: pharmacy302@126.com  
马致洁,女,主管药师,主要从事临床药学研究。Tel/Fax: (010)63139287 E-mail: 592628084@qq.com

collected samples had the larger hepatotoxic potency than that in the dried samples collected in the market. **Conclusion** The preliminarily established hepatotoxic potency bioassay is useful to evaluate the quality of *T. wilfordii* which directs the correlation with the drug's hepatotoxic adverse effect in clinic. The method can provide the reference for the clinical safety use of *T. wilfordii* based on the quality control and be as the quantitative method used to screen the toxic components from *T. wilfordii*

**Key words:** *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; *Tripterygium hypoglaucum* (Lévl.) Hutch.; hepatotoxicity; toxic potency; quality control

雷公藤为卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 的干燥根，性苦、寒，临床上多用于治疗类风湿性关节炎，现代研究发现其抗炎镇痛效果显著，有类激素样治疗效果，且无激素的不良反应，广泛用于治疗类风湿性关节炎等自身免疫性疾病，见效快，疗效确切，几乎没有可以完全替代的类似中药<sup>[1]</sup>。雷公藤全株有毒，其毒性最早记载于《本草纲目拾遗》，为中国植物图谱数据库收录的有毒植物，表现为对肝、肾、心功能有比较严重的毒副作用<sup>[2-4]</sup>。近年来雷公藤引起的毒性反应事件被频繁报道，为临床常见的致肝损害中草药之一<sup>[5-8]</sup>。

临床上中药肝损害的发生与患者个体差异以及中药质量关系密切。研究发现，雷公藤致肝损害并不是在所有患者身上都发生，较多研究表明雷公藤治疗类风湿性关节炎是较为安全的<sup>[9-11]</sup>，但同时雷公藤致肝损害也不在少数。雷公藤在南方还存在地方习用品昆明山海棠 *Tripterygium hypoglaucum*

(Lévl.) Hutch.。不同产地来源的雷公藤是否由于质量差异导致不同强度的毒性，因而引发临床肝损害，针对这个问题，本研究根据第4次全国中药资源普查提供的样品，尝试建立雷公藤肝细胞毒价检测方法，对雷公藤主要产区的药材样品及同属植物昆明山海棠的毒性进行评价，以期更准确地表征雷公藤药材的肝毒性作用，为提高其质量控制水平和临床安全用药提供参考依据。

## 1 材料

### 1.1 药物与试剂

采用第4次全国中药资源普查采集或采购的来自不同产地的18批雷公藤和5批昆明山海棠样品。本实验所有产地采集的样品均采挖于秋季(10月)，就地干燥，经解放军第三〇二医院全军中医药研究所肖小河研究员鉴定分别为雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 和昆明山海棠 *Tripterygium hypoglaucum* (Lévl.) Hutch. 的干燥根。样品信息见表1。

表1 雷公藤及昆明山海棠药材来源

Table 1 Sample sources of *T. wilfordii* and *T. hypoglaucum*

批次	产地	基源	备注	批次	产地	基源	备注
1	江西萍乡	雷公藤	产地采集	13	江西遂州	昆明山海棠	产地采集
2	浙江金华	雷公藤	产地采集	14	云南玉溪扬武镇	昆明山海棠	产地采集
3	浙江新昌儒岙镇	雷公藤	产地采集	15	安徽亳州药市	昆明山海棠	市场采集
4	湖南岳阳县城关镇	雷公藤	产地采集	16	广西清平药市	雷公藤	市场采集
5	湖南岳阳县蒋渭村	雷公藤	产地采集	17	安徽亳州药市	雷公藤	市场采集
6	湖南岳阳市岳阳县	雷公藤	产地采集	18	江西樟树天齐药业	雷公藤	市场采集
7	湖北通城沙堆镇	雷公藤	产地采集	19	云南菊花药市	雷公藤	市场采集
8	福建三明市泰宁朱口镇神下村	雷公藤	产地采集	20	云南菊花药市	雷公藤	市场采集
9	福建三明市泰宁朱口镇垵头村	雷公藤	产地采集	21	北京本草方源药业	雷公藤	市场采集
10	贵州黔东南苗族侗族自治州雷州县	雷公藤	产地采集	22	四川荷花药市	雷公藤	市场采集
11	贵州黔东南苗族侗族自治州剑河县	昆明山海棠	产地采集	23	河北安国药市	雷公藤	市场采集
12	湖南邵阳隆回县小沙江镇	昆明山海棠	产地采集				

Cell Counting Kit-8 (CCK-8, 日本同仁化学研究所, 批号 EW728), 对乙酰氨基酚 (批号 100020-200405) 购自中国食品药品检定研究院。

### 1.2 仪器

Synergy<sup>TM</sup> HT 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司), 实时细胞分析仪 (美国 Roche 公司), E-plate

16 检测板 (美国 Roche 公司), IX71 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), AL204 微量分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司), KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), 旋转蒸发仪 (德国 Heidolph 公司), ZK-82B 型真空干燥箱 (上海市实验仪器总厂), 恒温二氧化碳培养箱 (美国

NAPCO 公司)。

### 1.3 细胞系

人正常肝细胞 L02 细胞系购自中国典型培养物保藏中心, 在含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 进行常规培养, 实验均在细胞生长对数期进行。

## 2 方法

### 2.1 提取方式的考察

将雷公藤药材粉碎, 取 3 份雷公藤粗粉适量, 置于 3 个磨口锥形瓶中。分别加入 10 倍量 75% 乙醇, 浸泡 30 min。其中 1 份超声处理 (功率 300 W, 频率 40 kHz) 30 min; 1 份回流提取 30 min; 1 份冷浸 30 min, 均提取 1 次。提取液进行抽滤, 减压回收溶剂, 真空干燥, 得干浸膏, 计算得率, 备用。

### 2.2 提取溶剂的考察

将雷公藤药材粉碎, 取同 1 批次雷公藤粗粉 3 份适量, 置于 3 个磨口锥形瓶中, 分别加入 10 倍量 95%、75%、50% 的乙醇, 浸泡 30 min, 超声处理 30 min, 提取液进行抽滤, 减压回收溶剂, 真空干燥, 得干浸膏, 计算得率, 备用。

### 2.3 细胞生长曲线的测定

将 L02 细胞以  $1.40 \times 10^5$  /mL 接种在 E-16-plate 检测板上, 倍比稀释成  $7.00 \times 10^4$ 、 $3.50 \times 10^4$ 、 $1.75 \times 10^4$ 、 $8.75 \times 10^3$ 、 $4.38 \times 10^3$ 、 $2.22 \times 10^3$  /mL, 每个浓度设 2 个复孔。采用实时细胞分析仪 (real-time cell analyzers, RTCA), 每 20 分钟检测 1 次。E-16-plate 检测板底部具有微电极点阵传感器, 细胞贴附于电极后, 细胞生长在其上可产生细胞阻抗。若细胞状态如细胞数目、细胞形态及贴壁状态等发生变化, 会使 E-16-plate 检测板底的电流环路电阻相应发生改变。其中电阻与细胞指数 (cell index, CI) 值具有相关性, 通过 xCELLigence 系统追踪细胞变化情况<sup>[9-11]</sup>, 进行记录。

### 2.4 药物作用时间的确定

雷公藤药材溶解度较差, 因此加入适量的 DMSO 进行溶解, 通过对一系列体积分数 (4.800%、2.400%、1.200%、0.600%、0.300%、0.150%、0.075%) DMSO 进行考察, 发现 DMSO 体积分数为 0.3% 时能很好地溶解药物, 并且对细胞生长无影响, 因此选择加入 0.3% DMSO 溶解雷公藤药材。将 L02 细胞以  $3.5 \times 10^4$  /mL 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 200  $\mu$ L, 在常规条件下培养 24 h 后, 吸弃上清, 将雷公藤提取物以生药量的 5.000、2.500、1.250、0.625、

0.313、0.156 mg/mL 给药, 每孔 200  $\mu$ L。分别作用 12、24、48 h, 采用 CCK-8 法检测样品对细胞生长的抑制率<sup>[12]</sup>, 每个时间点设 6 个复孔。

### 2.5 雷公藤肝细胞毒价检测

将所配雷公藤样品溶液和对乙酰氨基酚对照品溶液, 按 1:0.65 的间距稀释, 以对乙酰氨基酚对照品溶液为对照组 (S), 不同产地雷公藤样品溶液为供试品组 (T), 分别测定对照品和供试品对肝细胞的毒性。首先定义对乙酰氨基酚毒价为 400 U/g, 将对照品溶液和供试品溶液各设高、低剂量组, 随机区组设计实验, 每个样品平行设 5 个复孔, 以细胞抑制率为效应指标。按照《中国药典》(二部) 2010 年版附录 XIV 生物检定统计法项下的量反应平行线法 (2.2) 检测雷公藤毒性效价<sup>[13]</sup>。

### 2.6 数据统计分析

数据组间比较采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 毒价检测采用国家药典委员会编制的《中国药典生物检定统计程序 BS2000》计算。

## 3 结果

### 3.1 药材不同提取方式提取效果比较

比较回流提取法、超声提取法、冷浸提取法 3 种常用的提取方法, 结果表明不同提取方法得到的样品对肝细胞的抑制作用差异较大 (图 1), 对肝细胞的抑制作用强度为超声提取 > 回流提取 > 冷浸提取, 超声提取显著高于回流、冷浸提取 ( $P < 0.05$ )。因此选择超声提取法对药材进行提取, 可更完整地体现雷公藤的肝毒性强度。

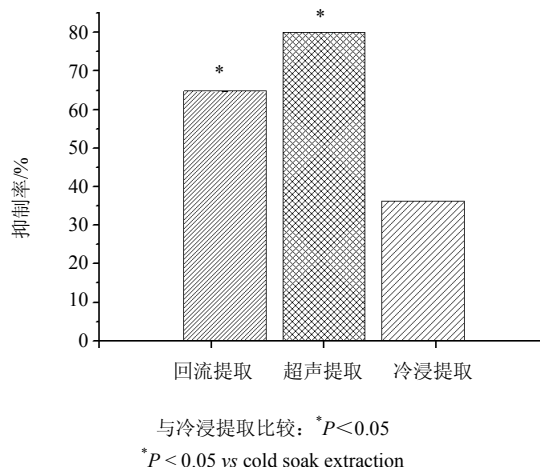


图 1 不同提取方法对雷公藤提取物 L02 细胞抑制作用的影响  
Fig. 1 Effect of *T. wilfordii* extract by different extracting methods on inhibition against L02 cells

### 3.2 提取溶剂的考察

比较不同体积分数(95%、75%、50%)乙醇提取的雷公藤提取物对L02细胞生长抑制作用,结果表明用50%乙醇提取时,雷公藤提取物对肝细胞的毒性最大,经方差分析显示,50%乙醇与75%乙醇提取差异不大( $P>0.05$ ),与95%乙醇提取相比有显著性差异( $P<0.05$ ),考虑到用50%乙醇提取药材更经济,因此选择50%乙醇提取药材。结果见图2。

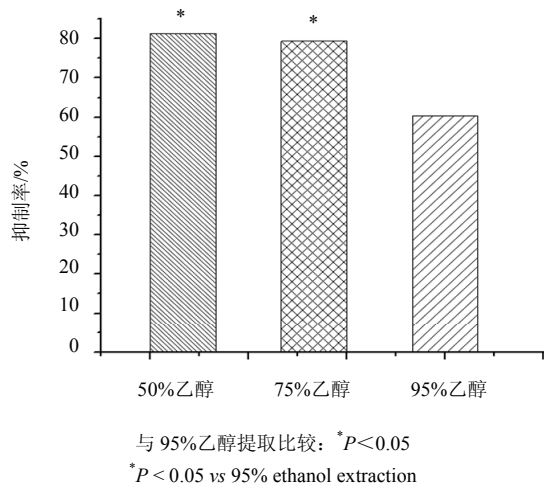


图2 不同提取溶剂对雷公藤提取物L02细胞抑制作用的影响  
Fig. 2 Effect of *T. wilfordii* extract from different extracting solvents on inhibition against L02 cells

### 3.3 细胞生长曲线的测定

不同浓度细胞生长曲线见图3,一般选择在细胞的对数生长期进行药物干预,并且其CI为1左右时更为合适。因此当细胞浓度为 $1.4\times 10^5/\text{mL}$ 及 $7\times 10^4/\text{mL}$ 时,细胞增长过快,其最佳给药时间在10h左右,不利于实验时间的安排。当细胞浓度为 $3.5\times 10^4/\text{mL}$ 时,最佳给药时间为24h左右。随着细胞浓度减小,给药时间延长,导致实验周期过长。故选择细胞浓度为 $3.5\times 10^4/\text{mL}$ 。

### 3.4 药物作用时间的确定

不同药物干预时间对细胞抑制作用结果见图4,细胞抑制率随着药物干预时间的增加而增加,药物孵育24h与药物孵育12、48h相比,呈现出更好的量效关系,故选择药物作用时间为24h。

### 3.5 不同产地雷公藤及昆明山海棠肝细胞毒价比较

本实验检测了资源普查从16个产地和药材市场收集的18份雷公藤样品和5份昆明山海棠样品的生物毒价,药材采集涉及了雷公藤主要的生产产地及

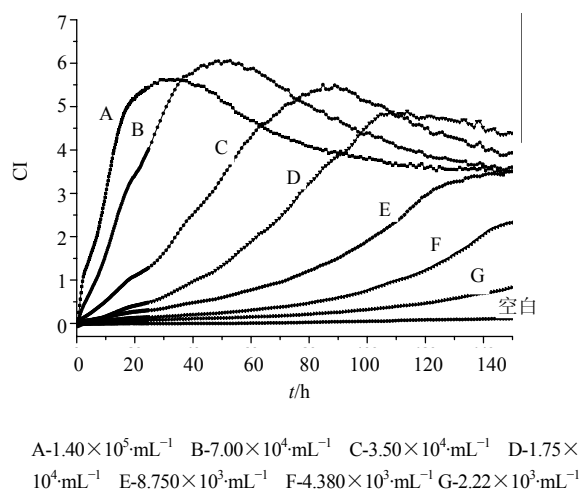


图3 不同接种密度的细胞生长状态曲线  
Fig. 3 Growth curves of different inoculation density of L02 cells

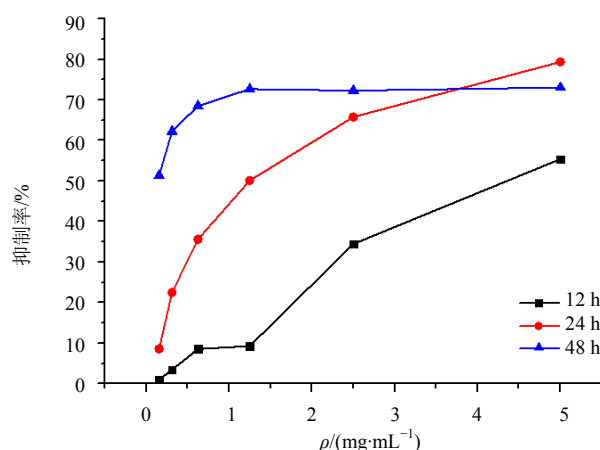


图4 不同作用时间对雷公藤提取物L02细胞抑制作用的影响  
Fig. 4 Effect *T. wilfordii* extract in different treatment times on inhibition of against L02 cells

部分市场采集的药材,在一定程度上较全面地代表了雷公藤药材的实际情况。毒价检测结果(图5)表明,雷公藤样品肝细胞毒价在17.78~4131.4 U/g,昆明山海棠样品肝细胞毒价在209.42~7422.2 U/g。进一步比较不同产地雷公藤样品毒价高低相差超过200倍,昆明山海棠样品毒价高低相差超过30倍,说明不同产地雷公藤及昆明山海棠药材毒价差异很大,其可能的原因为雷公藤种植区域广泛、生产加工储存等因素的影响。此外,产地采集的鲜品雷公藤毒性显著大于市场采集的雷公藤干货样品,即鲜品较干品的毒性大,提示雷公藤储存时间延长可能会降低其毒性。

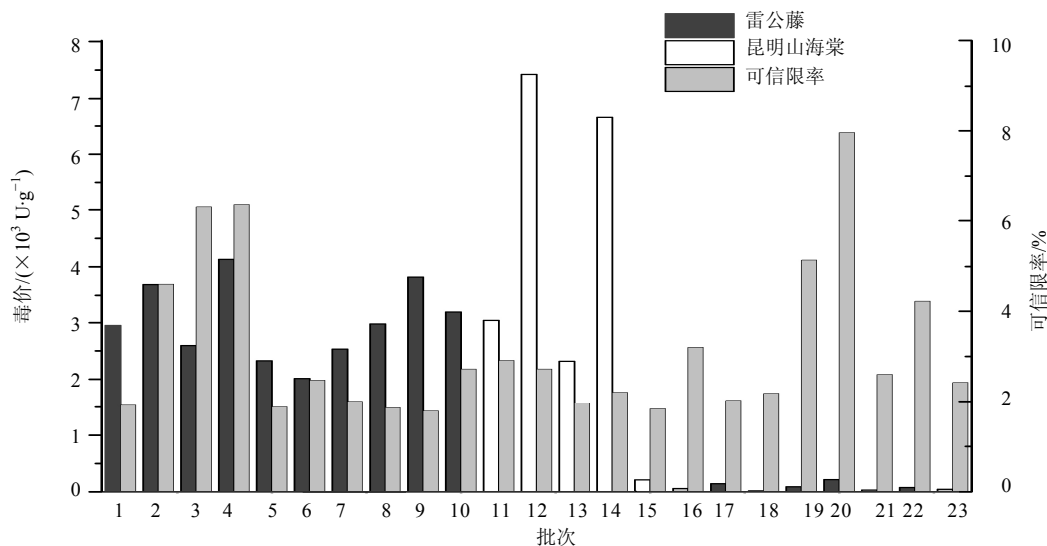


图 5 不同产地雷公藤及昆明山海棠药材肝细胞毒价

Fig. 5 Hepatotoxic potency of *T. wilfordii* and *T. hypoglaucaum* from different sources

#### 4 讨论

药材质量是保证临床疗效和安全性的前提。雷公藤因其药材来源广泛、生长环境差异大、生产加工工艺的不同，可能造成药材的质量参差不齐，因而可能导致临床毒副作用发生。服用雷公藤造成肝损伤主要与用药剂量、不同给药部位及给药时间均密切相关。雷公藤有效剂量与中毒剂量接近，并且当前研究结果表明雷公藤有效成分同时又是毒性成分且治疗窗较窄<sup>[14-15]</sup>，导致其毒性不易控制，药效不稳定，并且雷公藤药材总毒性成分难以去除或降低，据临床观察雷公藤的毒副作用发生率可达 50%<sup>[16-17]</sup>。雷公藤全植物均有不同程度的毒性，其芽、叶、花和根皮中有毒成分的量最高，据文献报道以嫩芽及叶的毒性最强，花次之，根皮再次之，木质部最小；将不同季节采收的雷公藤提取物进行小鼠急性毒性实验，结果发现夏季采收的毒性较大，以秋季采收毒性相对较小<sup>[18-19]</sup>。本研究发现，不同产地的雷公藤药材的肝细胞毒性大小差异显著，毒价高低相差 200 余倍，并且其同属地方习用品昆明山海棠的毒性比雷公藤相对更高。同时发现产地采集的鲜品雷公藤毒性显著大于市场采集的雷公藤干货样品，即鲜品较干品的毒性大。这些结果提示由于雷公藤质量不同，可能对其临床应用的安全性带来巨大影响。加强雷公藤毒副作用相关的质量控制，对提高雷公藤临床用药安全具有重要意义。

雷公藤所含成分较复杂，目前对雷公藤肝毒性物质基础的研究尚不深入，主要集中在雷公藤

甲素<sup>[20-21]</sup>，而对其他化学成分研究较少。中药的药效和毒性是其内含物质群整体协同作用的结果，雷公藤甲素与雷公藤中其他成分的毒性差异、构毒关系尚不清楚，加强雷公藤肝毒性物质基础的研究十分重要。本实验建立的基于肝细胞毒价检测的雷公藤质量评价方法，直接关联其临床肝脏毒副作用，对从质量控制角度提高雷公藤临床用药安全具有参考价值。进一步以生物毒价为评价指标，找到高效低毒的药材资源，明确雷公藤毒性物质基础、功效物质基础以及二者之间的关系，合理利用炮制、配伍等降低其毒性，对于保证雷公藤安全有效地用药具有重要意义。

#### 参考文献

- [1] 薛 璟, 贾晓斌, 谭晓斌, 等. 雷公藤的肝毒性研究及 ADME/Tox 评价思路 [J]. 中草药, 2009, 40(4): 655-658.
- [2] 冯 群, 栾永福, 孙 蓉. 基于功效和物质基础的雷公藤毒性研究进展 [J]. 中国药物警戒, 2013, 10(2): 88-92.
- [3] 黄郑隽, 阙慧卿, 朱 惠, 等. 雷公藤甲素对生殖系统毒性的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(3): 224-227.
- [4] 马伟光, 张 滔, 张 超, 等. 有毒药物雷公藤的研究及展望 [J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(2): 117-120.
- [5] 柴 智, 周文静, 高 丽, 等. 雷公藤肝毒性及其作用机制的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 243-246.
- [6] 丁 虹, 吴建元, 童 静, 等. 雷公藤甲素急性毒性及其机制研究 [J]. 中药材, 2004, 27(2): 115-118.

- [7] 强春倩, 刘世任, 都本敏. 雷公藤药理研究进展 [J]. 中国中医急症, 2006, 15(2): 198-199.
- [8] 张 静, 江 莹, 王 芳, 等. 基于“异类相制”理论探讨雷公藤肝毒性配伍减毒的作用 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2711-2715.
- [9] 谷 颖. 雷公藤在免疫性疾病治疗中的临床应用 [J]. 中国医药指南, 2011, 28(9): 241-242.
- [10] 郭梦如, 何东仪. 雷公藤治疗类风湿关节炎的研究进展 [J]. 风湿病与关节炎, 2013, 2(2): 58-62.
- [11] 向 明, 张程亮. 雷公藤免疫抑制作用研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(3): 458-461.
- [12] 熊建文, 肖 化, 张镇西. MTT 法和 CCK-8 法检测细胞活性之测试条件比较 [J]. 激光生物学报, 2007, 16(5): 559-562.
- [13] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [14] 薛 璟, 贾晓斌, 谭晓斌, 等. 雷公藤化学成分及其毒性研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(5): 726-733.
- [15] 骆永伟, 施 畅, 原 野, 等. 雷公藤甲素的毒理学研究进展 [J]. 毒理学杂志, 2009, 23(1): 74-77.
- [16] Saag K G, Teng G G, Patkar N M, *et al.* American college of rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Care Res*, 2008, 59(6): 762-784.
- [17] James Z X, Zhu L J, Jackson J A, *et al.* Dynamic monitoring of cytotoxicity on microelectronic sensors [J]. *Chem Res Toxicol*, 2005, 18(2): 154-161.
- [18] 郭艳红, 谭 晔. 雷公藤的毒性及其研究概况 [J]. 中药材, 2007, 30(1): 112-117.
- [19] 王月敏, 张世良, 夏素霞, 等. 雷公藤的毒性研究及对策 [J]. 四川生理科学杂志, 2008, 30(1): 28-31.
- [20] Jessica M B, Huang L, Xie L, *et al.* A cell-microelectronic sensing technique for profiling cytotoxicity of chemicals [J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 615(1): 80-87.
- [21] Ebru U, Haertel U, Styllou M, *et al.* Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts [J]. *Dent Mater*, 2010, 26(1): 51-58.