

龙须藤多甲氧基总黄酮对小鼠的急性毒性及抗胃溃疡作用研究

周 臻, 李嘉俊

广东药科大学, 广东 广州 510006

摘要:目的 对龙须藤多甲氧基总黄酮(PMFBC)的小鼠急性毒性及抗胃溃疡作用进行评价。方法 以 Bliss 法测定 PMFBC 的半数致死量 (LD₅₀), 评价其急性毒性; 采用吲哚美辛、乙醇、水浸应激 3 种胃溃疡模型评价 PMFBC 对小鼠急性胃溃疡的保护作用。结果 PMFBC ig 给药对小鼠的 LD₅₀ 值为 1 256.319 mg/kg, 表现出一定的急性毒性; PMFBC 对 3 种胃溃疡模型均有较好的保护作用, 可使小鼠胃溃疡面积明显减小, 具有较高的溃疡抑制率。结论 PMFBC 对小鼠胃溃疡的形成具有明显抑制作用, 在一定剂量范围内可安全使用。

关键词: 龙须藤; 多甲氧基黄酮; 急性毒性; 胃溃疡; 吲哚美辛; 乙醇; 水浸应激

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)12-2942-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.12.032

Acute toxicity of total polymethoxyflavones from *Bauhinia championii* in mice and its effects on gastric ulcer

ZHOU Zhen, LI Jia-jun

Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To study the acute toxicity of total polymethoxyflavones from *Bauhinia championii* (PMFBC) in mice and its effect on experimental gastric ulcer. **Methods** The acute toxicity of PMFBC was investigated by Bliss method. Three kinds of gastric ulcer model including indomethacin, ethanol, and water immersion-restraint stress were used to observe the effect of PMFBC in mice. **Results** The LD₅₀ value of ig administration PMFBC on mice was 1 252.319 mg/kg, which showed acute toxicity; PMFBC had protective effect on three gastric ulcer models, which could significantly reduce the ulcer area of the mice, and had a high inhibition rate. **Conclusion** PMFBC has obvious inhibition effect on the formation of gastric ulcer in mice, which can be safely used in a certain dose range.

Key words: *Bauhinia championii* (Benth.) Benth.; polymethoxyflavones; acute toxicity; gastric ulcer; indomethacin; ethanol; water immersion-restraint stress

胃溃疡是人类消化系统常见病、多发病,属于中医“胃脘痛”“痞满”“吞酸”等范畴,多由饮食不节、情志刺激、六淫伤中等病因导致^[1-2]。目前临床上常用的药物有 H₂ 受体阻滞剂和质子泵抑制剂,但仍然存在不良反应多、复发率高等问题。龙须藤为豆科苏木亚科羊蹄甲属植物龙须藤 *Bauhinia championii* (Benth.) Benth. 的干燥藤茎。龙须藤是我国东南沿海的特色草药,又称过岗圆龙、九龙藤等。其性平、味甘、微苦,归肝、大肠经,临床多用于风湿痹痛、卒中瘫痪、胃脘胀痛等症^[3-4]。龙须藤多甲氧基总黄酮(total polymethoxyflavones from *Bauhinia championii*,

PMFBC)是从龙须藤中提取分离得到的以多甲氧基黄酮类成分为主要物质基础的提取部位,前期研究^[5-6]表明,其具有抗炎、镇痛等药理活性。检索国内外文献,尚未发现 PMFBC 关于胃溃疡相关研究的报道。本研究以吲哚美辛型、乙醇型和水浸应激型小鼠胃溃疡为模型,探讨了不同质量浓度的 PMFBC 对模型小鼠胃溃疡的预防作用并对其急性毒性进行考察,为将 PMFBC 用于临床防治胃溃疡提供了实验依据。

1 材料

1.1 药材

龙须藤购于广东清平药材市场,经广东药科大

收稿日期: 2018-05-20

基金项目: 广东省普通高校青年创新人才项目 (2017KQNCX110)

作者简介: 周 臻 (1984—), 男, 硕士, 研究方向为化学工程与制药工艺。Tel: (0760)88207909 E-mail: zhouzhen0802@126.com

学中药学院李书渊教授鉴定为豆科苏木亚科羊蹄甲属植物龙须藤 *Bauhinia championii* (Benth.) Benth. 的干燥藤茎。

1.2 实验动物

昆明种小鼠，雌雄兼用，体质量 18~22 g，购自南方医科大学实验动物中心，合格证号 SCXK (粤) 20160041。

1.3 药品与试剂

奥美拉唑购自山东罗欣药业集团股份有限公司，批号 616105011；盐酸雷尼替丁购自吉林显锋科技制药有限公司，批号 20160501；无水乙醇，购自天津市致远化学试剂有限公司；水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 PMFBC 的提取及定量测定

取干燥的龙须藤药材 5 kg，粉碎后加 70%乙醇 10 倍量，回流提取 3 次，每次 2 h，滤过后减压回收乙醇至无醇味，以每次加醋酸乙酯溶剂 1:1 的量萃取 4 次，回收溶剂得醋酸乙酯部位浸膏 375 g^[7]。精密称取龙须藤醋酸乙酯部位浸膏 150 g，用 20%乙醇溶解，并稀释至 3 000 mL 作为上样溶液（每毫升相当于生药量 0.66 g）。取上样液以 2 BV/h 的上样体积流量通过装有大孔树脂 600 g（湿质量）的树脂柱，树脂柱的径高比为 1:9，以 5 BV 水和 8 BV

的 35%乙醇洗脱杂质后，用 10 BV 的 75%乙醇洗脱。回收 75%乙醇洗脱液，浓缩、干燥，得纯化物。再经硅胶柱色谱，上样量与硅胶用量为 1:10（质量比），洗脱溶剂系统为二氯甲烷-醋酸乙酯（8:1），薄层色谱法（TLC）跟踪分析，合并相同部位，最终分离得到 PMFBC（2.43 g，经 HPLC 测定^[8]，PMFBC 中含 5,6,7,5'-四甲氧基-3',4'-亚甲二氧基黄酮 12.61%、5,6,7,3',4'-五甲氧基黄酮 16.38%、5,6,7,2',4',6'-六甲氧基黄酮 8.16%、5,7,3',4',5'-五甲氧基黄酮、24.69%，4 者总质量分数为 61.84%）。

2.2 PMFBC 对小鼠的急性毒性^[9]

经预试验，找出 PMFBC 小鼠 ig 给药 100%死亡的最小剂量为 2 560 mg/kg，0 死亡的最大剂量为 536.870 9 mg/kg，在此区间，按 1:0.8 剂间比另设 6 个剂量组。取 80 只健康昆明种小鼠，按体质量与性别随机分成 8 组，每组 10 只，雌雄各半，实验前禁食不禁水 12 h。8 组小鼠分别按 2 560.000 0、2 048.000 0、1 638.400 0、1 310.720 0、1 048.576 0、838.860 8、671.088 6、536.870 9 mg/kg 剂量，1 次性 ig 给予 PMFBC，ig 给药体积为 30 mL/kg。给药后，连续 10 d 对各组小鼠的外观、行为和毒性反应进行观察，并统计各剂量组死亡率，用 Bliss 法^[10]计算半数致死量（LD₅₀），结果见表 1。

表 1 PMFBC 对小鼠的急性毒性实验结果 (n = 10)

Table 1 Aute toxicity of PMFBC in mice (n = 10)

组号	剂量/(mg·kg ⁻¹)	对数剂量	死亡数/只	死亡率/%
1	2 560.000 0	3.408 2	10	100
2	2 048.000 0	3.311 3	8	80
3	1 638.400 0	3.214 4	7	70
4	1 310.720 0	3.117 5	5	50
5	1 048.576 0	3.020 6	4	40
6	838.860 8	2.923 7	2	20
7	671.088 6	2.826 8	1	10
8	536.870 9	2.729 9	0	0

根据表 1 结果，通过 Bliss 法计算：LD₅₀ = 1 256.319 mg/kg；95%的可信限为 1 073.455~1 480.431 mg/kg；LD₅ = 608.560 mg/kg；LD₉₅ = 2 593.564 mg/kg；回归方程 Y (Probit) = -16.193 + 5.225 lgD。

小鼠的中毒症状为自发活动减少，躯体蜷缩，瞳孔缩小，不食。死亡时间集中在给药后第 1~2 天，死亡小鼠解剖肉眼观察主要脏器未见明显异常改变，

未死亡小鼠从给药后第 2 天开始恢复正常饮食及活动，并在 10 d 连续观察期内，未出现其他中毒反应，且死亡情况未继续发生。给药 10 d 后处死所有小鼠，解剖肉眼观察其主要脏器未见明显异常改变。

2.3 PMFBC 对小鼠胃溃疡的影响

2.3.1 对吡啶美辛型小鼠胃溃疡的影响^[11] 60 只小鼠随机分为 6 组，每组 10 只，分别为模型组、奥美拉唑（5 mg/kg）组、盐酸雷尼替丁（50 mg/kg）

组和 PMFBC 低、中、高剂量 (3.9、7.8、15.6 mg/kg) 组。G 各给药组每天 ig 给药 1 次, 模型组 ig 给予等量生理盐水, 连续 7 d。末次给药前 24 h 禁食不禁水, 于末次给药 1 h 后小鼠 ig 吡哌美辛 (50 mg/kg), 1 h 后用戊巴比妥钠麻醉小鼠, 处死。用手术剪打开小鼠腹腔找到胃, 分别结扎贲门、幽门端后取出胃, 向胃内注入 1% 甲醛溶液 1 mL, 将全胃置于装有 1% 甲醛溶液的烧杯中固定 20 min, 取出沿胃大弯剪开, 以生理盐水冲洗内容物, 用滤纸吸干水分, 展平, 按公式计算溃疡面积, 并计算溃疡抑制率 (下同)。各组实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (下同)。结果见表 2。

溃疡面积 = Σ (溃疡长径 $\times$ 溃疡宽径)

溃疡抑制率 = (模型组平均溃疡面积 - 实验组平均溃疡面积) / 模型组平均溃疡面积

由表 2 可知, 与模型组相比, PMFBC 各剂量组和奥美拉唑以及盐酸雷尼替丁阳性对照组均可显著降低溃疡面积 ($P < 0.01$), PMFBC 低、中、高剂量组溃疡抑制率分别为 50.27%、61.31%、65.58%。

表 2 PMFBC 对小鼠吡哌美辛型胃溃疡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 2 Effect of PMFBC on gastric ulcer area caused by indomethacin in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	溃疡 面积/mm ²	溃疡 抑制率/%
模型	—	33.96 ± 2.65	—
奥美拉唑	5	10.81 ± 2.18**	68.17
盐酸雷尼替丁	50	14.05 ± 2.57**	58.63
PMFBC	3.9	16.92 ± 1.59**	50.27
	7.8	13.14 ± 1.11**	61.31
	15.6	11.69 ± 1.25**	65.58

与模型组比较: ** $P < 0.01$, 下同

** $P < 0.01$ vs model group, same as below

2.3.2 对乙醇型小鼠胃溃疡的影响^[12] 60 只小鼠分组及给药同“2.3.1”项, 末次给药前 24 h 禁食不禁水, 于末次给药 1 h 后小鼠 ig 无水乙醇 (10 mL/kg), 1 h 后戊巴比妥钠麻醉小鼠, 处死。按“2.3.1”项方法处理胃, 并计算溃疡面积及溃疡抑制率, 结果见表 3。与模型组相比, PMFBC 各剂量组和奥美拉唑以及盐酸雷尼替丁阳性对照组均可显著降低溃疡面积 ($P < 0.01$), PMFBC 低、中、高剂量组溃疡抑制率分别为 56.80%、76.41%、77.41%。

2.3.3 对水浸应激型小鼠胃溃疡的影响^[13] 60 只小鼠分组及给药同“2.3.1”项, 末次给药前 24 h 禁食不禁水, 于末次给药 1 h 后, 放入特制的应激盒内, 浸在 (21 ± 1) °C 的水中, 使水面达其胸骨剑突水平, 20 h 即可。取出小鼠, 戊巴比妥钠麻醉, 处死。按“2.3.1”项方法处理胃, 并计算溃疡面积及溃疡抑制率, 结果见表 4。与模型组相比, PMFBC 各剂量组和奥美拉唑以及盐酸雷尼替丁阳性对照组均可显著降低溃疡面积 ($P < 0.01$), PMFBC 低、中、高剂量组溃疡抑制率分别为 51.04%、64.14%、73.70%。

表 3 PMFBC 对小鼠乙醇型胃溃疡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 3 Effects of PMFBC on gastric ulcer area caused by ethanol in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	溃疡 面积/mm ²	溃疡 抑制率/%
模型	—	72.26 ± 0.42	—
奥美拉唑	5	15.34 ± 0.35**	78.77
盐酸雷尼替丁	50	23.54 ± 0.52**	67.42
PMFBC	3.9	31.21 ± 0.18**	56.80
	7.8	17.04 ± 0.24**	76.41
	15.6	16.32 ± 0.33**	77.41

表 4 PMFBC 对小鼠水浸应激型胃溃疡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 4 Effects of PMFBC on gastric ulcer area caused by water immersion-restraint stress in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	溃疡 面积/mm ²	溃疡 抑制率/%
模型	—	44.57 ± 1.58	—
奥美拉唑	5	18.99 ± 1.58**	57.39
盐酸雷尼替丁	50	20.48 ± 1.91**	54.05
PMFBC	3.9	21.82 ± 1.87**	51.04
	7.8	15.98 ± 1.11**	64.14
	15.6	11.72 ± 1.83**	73.70

3 讨论

PMFBC 是前期课题组从龙须藤中提取分离制备得到的黄酮类化合物, 主要由 5,6,7,5'-四甲氧基-3',4'-亚甲二氧基黄酮、5,6,7,3',4',5'-六甲氧基黄酮、5,6,7,3',4'-五甲氧基黄酮、5,7,3'-三甲氧基-4',5'-亚甲二氧基黄酮和 5,7,3',4',5'-五甲氧基黄酮组成。为评价 PMFBC 的安全性及对胃溃疡的预防作用, 本实验考察了 PMFBC 的小鼠急性毒性和对不同胃溃疡模型的影响。

急性毒性实验结果表明, PMFBC ig 给药对小

鼠的 $LD_{50}=1\ 256.319\text{ mg/kg}$, 95%的可信限范围较窄, 方法精确度较高。虽然 PMFBC ig 给药对小鼠表现出一定的急性毒性, 但其 LD_{50} 远大于临床剂量: PMFBC $LD_{50}\ 1\ 256.319\text{ mg/kg}$, 相当于生药 $1\ 030.715\text{ g/kg}$, 约为临床人体安全用量的 $2\ 000\sim4\ 000$ 倍 (按龙须藤药材临床成人用量 $15\sim30\text{ g}^{[3]}$, 体质量 60 kg , 计算剂量为 $0.25\sim0.50\text{ g/kg}$)。一般认为, 小鼠最大给药量按体质量计算, 相当于成人临床日用量 100 倍以上则是较为安全的^[9]。而研究后续进行的药效学实验所用 PMFBC 剂量 (3.9 、 7.8 、 15.6 mg/kg) 也远低于 LD_{50} 。因此, 本研究认为 ig 给予 PMFBC 在一定剂量内安全性较高。

目前对胃溃疡的发生机制多认为与攻击因子和防御因子的失衡有关。吡啶美辛为非甾体抗炎药, 与胃黏膜屏障发生作用改变细胞膜的通透性, 进而影响黏膜血流和细胞再生, 属于减弱防御因子而引发的胃溃疡^[14]。乙醇是重要的胃黏膜攻击性因子^[15], 由于其亲脂性和脂溶性, 乙醇不仅可破坏黏膜内及黏膜下的正常组织结构, 还可增加 H^+ 弥散, 损伤正常的能量代谢, 从而破坏细胞功能。应激性溃疡的发病机制较为复杂, 迄今尚未完全阐明, 一般认为其形成的原因主要和胃黏膜的破坏与胃酸分泌的增加有关^[16]。本研究采用口服吡啶美辛、口服乙醇、水浸应激 3 种胃溃疡模型研究 PMFBC 对胃溃疡的影响, 结果表明 PMFBC 可以减少溃疡面积, 具有预防胃溃疡的作用。

胃部组织发炎后, 血液中的白细胞介素-6 (IL-6)、IL-12 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等炎症相关因子的含量会明显升高^[17]。有研究^[18-19]显示, 胃溃疡时部分组织由于受损伤出现的被氧化现象, 与体内脂质过氧化酶作用增强、氧自由基产生过多而引起的细胞流动性下降有关。另有研究^[20-21]表明, 龙须藤醋酸乙酯提取物具有明显的抗氧化、清除自由基的作用, 且多甲氧基黄酮具有较强的抗氧化能力。故考虑 PMFBC 抗溃疡的作用机制可能与其抗氧化活性有关, 其具体抗溃疡机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 徐 丹. 金铃子散抗实验性胃溃疡的药效学及作用机制研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2016.
- [2] 陈伟良, 伍振峰, 邓中银, 等. 中医药在抗胃溃疡研究应用中的现状与进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 362-367.

- [3] 广东省中药材标准 (第 2 册) [S]. 2011.
- [4] 桑 彤. 痛经一贴灵散中九龙藤的薄层色谱鉴别 [J]. 中草药, 2000, 31(12): 911.
- [5] 易荆丽, 张嘉家, 周毅生, 等. 龙须藤提取物的镇痛抗炎作用 [J]. 广东药学院学报, 2012, 28(6): 647-651.
- [6] 莫海珊, 周毅生, 黄叶东, 等. 龙须藤总黄酮对佐剂关节炎大鼠的治疗作用及机制 [J]. 中成药, 2017, 39(3): 593-596.
- [7] 林丽微, 周毅生, 周 臻, 等. 基于药效学跟踪试验提取分离龙须藤总黄酮及其含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(5): 103-106.
- [8] 周 臻, 吴晓敏, 周毅生. DAD-HPLC 法同时测定龙须藤总黄酮中 5 种多甲氧基黄酮 [J]. 中成药, 2017, 39(4): 864-866.
- [9] 胡 璇, 李卫东, 张硕峰, 等. 四倍体金银花水提物抗炎作用和急性毒性实验研究 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1649-1652.
- [10] 杨海智, 马海霞, 杨信东. 国内关于半数致死量及类似生物效应指标测算方法研究进展 [J]. 国外医药: 抗生素分册, 2012, 33(2): 62-66.
- [11] 卢成文, 李 丽, 邓衍威, 等. 雪山胃宝丸对小鼠胃溃疡的保护作用 [J]. 西部中医药, 2016, 29(1): 21-25.
- [12] 刘小花, 梁 瑾, 梁建娣, 等. 黄芪抗胃溃疡作用的谱效关系研究 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2448-2452.
- [13] 王丽娟, 王 勇, 韩淑珍, 等. 独一味抗应激性溃疡的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 769-770.
- [14] 陈志东. 消化性胃溃疡模型在研究新药中的应用 [J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(15): 2137-2138.
- [15] 卢文丽, 方肇勤, 潘志强, 等. 不同方法致实验性胃溃疡小鼠的同病异证 [J]. 湖南中医杂志, 2008, 24(1): 69-72.
- [16] 刘纳文, 李志军. 加味丹参饮对家兔应激性胃溃疡的影响 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1112-1115.
- [17] 于 艳, 贾天柱, 才 谦. 茅苍术及其麸炒品对胃溃疡大鼠抗炎作用的比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(4): 705-710.
- [18] 杨 健. 维胃方对实验性胃溃疡大鼠氧自由基代谢影响的研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2012.
- [19] 陈建章, 陈 文, 王小平, 等. 半四左方对实验性胃溃疡大鼠 ET、SOD、MDA 的影响 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(8): 2037-2038.
- [20] 高 杰, 林炜鑫, 钟屿云, 等. 九龙藤乙酸乙酯提取物清除自由基、镇痛抗炎作用研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(36): 22305-22306.
- [21] 林炜鑫, 孙 瑶, 苏福海, 等. 九龙藤黄酮对 H_2O_2 诱导乳鼠心肌细胞凋亡的抑制作用 [J]. 中国新药与临床杂志, 2014, 33(1): 39-43.