

土茯苓解重金属铅毒性物质基础的初步研究

李洁¹, 程双¹, 董丹阳¹, 彭财英¹, 王晓敏², 刘建群¹, 舒积成^{1*}

1. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

2. 江西中医药大学基础医学院, 江西 南昌 330004

摘要: **目的** 探究土茯苓解重金属铅毒性的活性物质。**方法** 以“总提取物-有效萃取部位-有效部位及有效成分”顺序逐一追踪解毒活性成分的研究思路, 以急/慢性铅致小鼠毒性为动物模型, 以铅含量、生化指标及组织形态学检测结果为指标, 确认土茯苓解铅毒的活性部位。依据文献及前期化学研究基础, 采用高效液相色谱 (HPLC) 法对活性部位进行主要成分分析。**结果** 急性铅中毒实验结果显示, 与模型组相比, 土茯苓总提物组和醋酸乙酯组小鼠血液、肝和肾脏中铅含量显著降低 ($P < 0.05$); 血清丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量有所降低 ($P < 0.05$), 谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性有不同程度提高 ($P < 0.05$); 小鼠肝和肾损伤程度均有改善。慢性铅中毒实验结果显示, 与模型组相比, 土茯苓总黄酮低、中、高剂量组小鼠血液、肝和肾脏铅含量均有下降 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性; 小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活性和肌酐 (creatinine, Cr)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 水平均有不同程度地降低 ($P < 0.05$), 并以土茯苓总黄酮高剂量组最为显著; 小鼠肝和肾损伤程度均有所改善, 且土茯苓总黄酮高剂量组组织结构趋近正常。新落新妇苷、落新妇苷、花旗松素、新异落新妇苷、异落新妇苷和黄杞苷 6 个黄酮类化合物为总黄酮部位的主要成分, 占总黄酮的 58.89%。**结论** 土茯苓醋酸乙酯部位对铅致小鼠急性毒性有显著解毒作用, 且醋酸乙酯部位优于总提物, 提示醋酸乙酯部位为土茯苓解铅毒的有效萃取部位; 土茯苓总黄酮具有较好的排铅作用, 对铅诱导的肝、肾功能损伤具有一定的保护作用, 且呈剂量相关性, 提示总黄酮为土茯苓解重金属铅毒的活性部位。土茯苓总黄酮主要由新落新妇苷、落新妇苷、花旗松素、新异落新妇苷、异落新妇苷和黄杞苷 6 个黄酮类化合物组成, 提示上述化合物可能为土茯苓解铅毒的活性成分。

关键词: 土茯苓; 总黄酮; 解重金属铅毒; 新落新妇苷; 落新妇苷; 花旗松素; 新异落新妇苷; 异落新妇苷; 黄杞苷

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)01-0117-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.01.015

Primary investigation for material basis of *Smilax glabra* for detoxification of heavy metal Pb

LI Jie¹, CHENG Shuang¹, DONG Dan-yang¹, PENG Cai-ying¹, WANG Xiao-min², LIU Jian-qun¹, SHU Ji-cheng¹

1. Key Laboratory of Modern Chinese Medicine Preparation, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicines, Nanchang 330004, China

2. Basic Medical College of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: **Objective** To investigate the active components for relieving the toxicity of heavy metal Pb from Tufuling (*Smilaxis Glabrae Rhizoma*). **Methods** The research order from identifying total extract, effective extraction parts to effective parts and effective components was used. The acute and chronic toxicity induced by Pb mice models were established. The detoxification effects were evaluated by Pb content, biochemical indexes and morphological detection. According to the literature and previous chemical research, HPLC was used to analyze the principal components of the active parts. **Results** The results of acute toxicity test showed that compared with model group, Pb contents in blood, liver and kidney of mice in total extract from *Smilaxis Glabrae Rhizoma* group and ethyl acetate fraction group were significantly lower than that of model group ($P < 0.05$); The content of malondialdehyde (MDA)

收稿日期: 2021-09-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81760721); 国家自然科学基金资助项目 (81760703); 江西省自然科学基金资助项目 (20161BAB205219, 20181BAB205077)

作者简介: 李洁 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药化学。Tel: 15270819030 E-mail: 2236759877@qq.com

*通信作者: 舒积成, 男, 教授。Tel: (0791)87118658 E-mail: shujc210@163.com

in serum was decreased ($P < 0.05$), glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) activities were increased ($P < 0.05$); Liver and kidney damages were ameliorated. The results of slow toxicity test showed that compared with model group, Pb contents in blood, liver and kidney of mice in total flavonoids of *Smilacis Glabrae Rhizoma* group were significantly reduced with dose-dependent manner ($P < 0.05$); Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) activities and creatinine (Cr), blood urea nitrogen (BUN) levels in serum were reduced ($P < 0.05$), and high-dose total flavonoids of *Smilacis Glabrae Rhizoma* group was most significant; Liver and kidney damages in mice were relieved, and tissue structure of high-dose total flavonoids of *Smilacis Glabrae Rhizoma* group showed almost like normal. The main components of total flavonoids were neoastilbin, astilbin, taxifolin, neoIsoastilbin, isoastilbin and engelitin, which account for 58.89% of total flavonoids. **Conclusion** Ethyl acetate extraction parts from *Smilacis Glabrae Rhizoma* shows significant detoxification effect on Pb-induced toxicity in mice, and ethyl acetate extraction part was better than total extract in general, suggesting that ethyl acetate extraction part is the effective extraction part of *Smilacis Glabrae Rhizoma* to detoxify Pb; Total flavonoids of *Smilacis Glabrae Rhizoma* shows good lead excretion effect, and shows protective effect on liver and kidney damage induced by Pb with dose-dependent relationship. Besides, total flavonoids of *Smilacis Glabrae Rhizoma* are mainly composed of six flavonoids including neoastilbin, astilbin, taxifolin, neoisoastilbin, isoastilbin and engelitin, which suggests that these compounds may be the active components of *Smilacis Glabrae Rhizoma* in relieving Pb toxicity.

Key words: *Smilacis Glabrae Rhizoma*; total flavonoids; detoxification of heavy metal Pb; neoastilbin; astilbin; taxifolin; neoisoastilbin; isoastilbin; engelitin

随着社会经济的发展,许多重金属被广泛使用,人类与重金属接触是极为普遍的现象,进而导致重金属中毒事件爆发率大幅度提高,而以铅中毒尤为突出^[1-2],如 2007 年卢氏县“12-12”铅中毒事件、2009 年济源数千名儿童血铅事件、2011 年广东河源铅中毒事件等。据不完全统计,铅中毒患者每年超过 5 万例^[3]。另外,重金属污染致慢性中毒具有不易察觉的特点,导致报道中毒患者数远远少于实际数字。重金属可诱导蛋白质结构发生改变,直接导致人的脑细胞和神经系统受到损伤,造成儿童智力低下及老年痴呆^[4]。重金属中毒严重干扰患者的健康水平及生活质量,尤其对儿童损害更为深远^[5],给患者带来不可估量的损失。重金属中毒已经成为国内外健康保障面临的难题之一,现已造成了广泛的社会问题,控制其发生与发展刻不容缓。寻找重金属中毒的预防及治疗的有效方法成为生命科学研究的重点课题之一。而目前临床应用的重金属解毒剂不能很好地满足其治疗需求,存在以下问题^[6-8]: ①驱毒作用弱或对部分重金属无效;②治疗周期长,一般为 1~2 年;③在治疗过程中,常伴随着过敏、微量元素缺乏、电解质不平衡和严重肝肾损害等不良反应;④大多有令人难于接受的气味,口服性较差。因此,研究开发疗效好、低毒和疗程短的新型解重金属毒的药物已是临床急需所趋。

土茯苓为百合科植物光叶菝葜 *Smilax glabra* Roxb. 的干燥根状茎,据《本草纲目》中记载:“惟土茯苓气平,味甘而淡……今医家治杨梅疮,不犯轻粉。服轻粉而筋骨挛痛,瘫痪不能动履者,服之

亦效”“健脾胃,强筋骨,去风湿,利关节,止泄泻,治拘挛骨痛,恶疮痈肿。解汞粉、银朱毒”。现代药理学研究表明,土茯苓对重金属汞、铅和砷等均有解毒作用^[9-11],提示土茯苓中可能含有能够解重金属毒的成分。然而,其解毒活性成分不清,药效物质基础不明。据此,本研究选取具代表性的重金属中毒元素铅为研究对象,初步阐明其解毒的药效物质基础,以期研发解铅毒新药提供理论基础。

文献及前期研究结果显示,土茯苓具有解重金属铅毒性作用^[10],提示土茯苓中可能有拮抗重金属铅的有效部位和有效成分;土茯苓中主要化学成分包括黄酮苷、木脂素和简单酚酸,上述成分在中等极性溶剂醋酸乙酯中具有较好的溶解性;二氢黄酮苷类衍生物为土茯苓提取物的醋酸乙酯化学部位的主要成分^[12-13]。据上述结果本课题组推测,醋酸乙酯化学部位可能为土茯苓拮抗铅毒性作用的有效萃取部位,总黄酮苷可能是其解铅毒性的有效部位。为了验证上述假设,本研究采用铅致小鼠急毒模型,比较土茯苓总提物及其醋酸乙酯萃取部位减毒作用,简单快速地证实醋酸乙酯萃取部位是否为有效萃取部位。再选择与现实铅中毒现状相符的铅致小鼠慢毒模型,以铅含量、生化指标及组织形态学检测结果为指标,综合评价总黄酮部位的减毒作用,如实地回答总黄酮是否为有效部位。再结合化学成分分析结果,初步阐明土茯苓解铅毒的活性成分。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性昆明种小鼠,6~8 周龄,体质量

18~22 g, 购自江西中医药大学实验动物中心, 动物许可证号 SCXK(赣)2018-0003。动物饲养于室温(20±2)℃、相对湿度 40%~60%、12 h 昼夜周期的环境中, 自由进食饮水, 适应性喂养 1 周后开始实验。动物实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号 JZLLSC20210026)。

1.2 药材

土茯苓购自广西省玉林市, 经江西中医药大学付小梅教授鉴定为百合科植物光叶菝葜 *S. glabra* Roxb. 的干燥根茎。

1.3 药品与试剂

石油醚(批号 2009261)、醋酸乙酯(批号 A2011201)、甲醇(批号 2008031)、三水合乙酸铅(批号 2005191)、乙腈(批号 1210131)、甲酸(批号 1502051)、福尔马林溶液(批号 1710202)购自西陇科学股份有限公司; 超纯水购自屈臣氏集团有限公司; 0.9%氯化钠溶液(批号 20112965)购自湖南金健药业有限责任公司; 丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(批号 20200919)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(批号 20200918)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒(批号 20200915)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒(批号 20200917)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒(批号 20200916)、肌酐(creatinine, Cr)试剂盒(批号 20200916)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)试剂盒(批号 20200916)购自南京建成生物工程研究所; 30%过氧化氢(批号 20180822)、硝酸(批号 20200911)购自国药集团化学试剂有限公司; ODS 填料(12 nm)购自日本 YMC 公司; 对照品新落新妇苷、落新妇苷、花旗松素、新异落新妇苷、异落新妇苷、黄杞苷为实验室自制, 质量分数≥98%。

1.4 仪器

超净工作台(无锡易纯净化设备有限公司); Multiskan Go 型全波长酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); SIGMA3-18K 型高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司); BS224S 型万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司); DZKW-D-2 型电热恒温水浴锅(上海科恒实业发展有限公司); X-HB 型旋涡混合器(江苏康健医疗用品有限公司); DB-1AB 型加热板(天津工兴实验室仪器有限公司); AA240 型

原子吸收光谱仪(美国 Agilent 公司); LC3000 I 型高效液相色谱仪(HPLC, 北京钢臣科技有限公司); DM2500 正置生物显微镜(德国 Leica 公司); 96 孔细胞培养板(南京建成生物工程研究所)。

2 方法

2.1 药物的制备

2.1.1 土茯苓总提物的制备 取土茯苓药材 500 g, 粉碎成小块, 置于圆底烧瓶中, 按料液比 1:8 加入双蒸水回流提取 3 次, 分别提取 3、2、2 h, 滤过, 合并提取液, 干燥, 得土茯苓总提物 83.1 g, 计算提取率为 16.6%。再取干燥的浸膏研细, 加超纯水溶解成混悬液, 即得土茯苓总提物溶液(99.6 mg/mL, 折算生药量 6 g/kg)。

2.1.2 土茯苓醋酸乙酯部位的制备 取土茯苓总提物干浸膏 80 g, 加适量双蒸水溶解, 依次采用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇进行萃取, 分别合并萃取液, 回收溶剂, 得石油醚、醋酸乙酯及正丁醇萃取部位浸膏, 称定质量, 分别为 2.4、21.1、9.6 g, 计算得率分别为 3.0%、26.2%、12.0%。取少量醋酸乙酯部位浸膏研细, 加入超纯水溶解成混悬液, 即得土茯苓醋酸乙酯部位溶液(26.1 mg/mL, 折算生药量 6 g/kg)。

2.1.3 土茯苓总黄酮的制备 取上述土茯苓醋酸乙酯部位浸膏 17.8 g, 用 25%甲醇水进行溶解, 以 ODS 为填料, 25%甲醇水溶液为上样溶剂冲洗 3 个柱体积, 收集洗脱液, 再用 60%甲醇水溶液为洗脱溶剂洗脱 3 个柱体积, 收集洗脱液, 将此部分洗脱液旋干, 得土茯苓总黄酮浸膏 14 g, 计算得率为 78.7%。再取适量总黄酮粉末, 用超纯水进行溶解, 制备得低、中、高质量浓度(10、20、30 mg/mL)的总黄酮水溶液, 分别折算生药量 3、6、9 g/kg。

2.1.4 醋酸铅水溶液的制备

(1) 40 mg/mL 醋酸铅水溶液: 精密称取无水醋酸铅粉末 0.4 g, 加 10 mL 超纯水溶解, 即得 40 mg/mL 醋酸铅水溶液。

(2) 0.9 mg/mL 醋酸铅水溶液: 精密称取无水醋酸铅粉末 1.8 g, 加 2 L 超纯水进行溶解, 即得 0.9 mg/mL 的醋酸铅水溶液。

2.2 土茯苓醋酸乙酯萃取部位解重金属铅毒性研究

2.2.1 动物分组、造模及给药 将 48 只雄性昆明种小鼠随机分为空白组、模型组、土茯苓总提物(6 g/kg)组和土茯苓醋酸乙酯(6 g/kg)组, 空白组饮用超纯水, 其余组 ip 质量浓度为 40 mg/mL 的醋酸

铅溶液 (4 mL/kg), 1 次/d, 连续 3 d, 建立急性铅中毒模型。铅中毒模型建立后, 各给药组 ig 药物 (10 mL/kg), 空白组和模型组 ig 0.9%氯化钠溶液, 每天早晚 2 次, 连续 3 d。末次给药后, 禁食不禁水 24 h。

2.2.2 血液及肝、肾组织中铅含量测定 末次给药 24 h 后, 每组随机取 6 只小鼠, 摘眼球取血于抗凝管中。采用石墨炉原子吸收光谱法^[14]测定血、肝和肾中铅含量, 样品处理方法如下。

(1) 血液样品的处理: 精密吸取各组抗凝血 0.5 mL 于 50 mL 锥形瓶中, 加入 10 mL 混合酸[浓硝酸-过氧化氢 (4:1)] 消化, 于次日在通风橱中开始加热消解, 120 °C 加热 1 h, 180 °C 加热 4~5 h, 再逐渐升温至 200 °C, 加热期间不时观察烧杯内液体颜色和量的变化, 若杯内液体过少且呈棕红色时, 则向杯内补加约 1~2 mL 混合酸, 若杯内液体变得澄清或略带黄色, 则向杯内加入超纯水赶酸。待杯内白烟冒尽, 少量液体为无色澄清或略显黄色时, 可取下锥形瓶至室温后, 将杯内液体转移至 10 mL 离心管中, 用 1%硝酸溶液冲洗表面皿, 同时润洗锥形瓶 3 次, 将每次的洗液转移至 10 mL 离心管, 最后用 1%硝酸溶液定容至刻度, 消解液放入 4 °C 冰箱保存待测。同法制备 2 个空白样品。

(2) 肝、肾组织样品的处理: 小鼠脱颈椎处死, 取肝、肾, 去除结缔组织, 0.9%氯化钠溶液洗去血渍, 再用滤纸吸干, 每组随机取 6 只小鼠肝肾用于测定铅含量, 于 -80 °C 冰箱保存。组织消解方法同血液样品消解方法一致。

2.2.3 生化指标的测定 每组用于铅含量测定后剩余的 6 只小鼠摘眼球取血, 室温静置 30 min, 3000 r/min 离心, 取血清, 按照试剂盒说明书测定各组血清 MDA 水平和 SOD、GSH-Px 活性。

2.2.4 肝、肾组织病理切片观察 用于铅含量测定后剩余 6 只小鼠脱颈椎处死, 取肝、肾组织, 用福尔马林溶液浸泡固定, 用苏木精-伊红 (HE) 染色法对肝、肾组织进行染色, 切片, 观察肝、肾组织的病理变化。

2.3 土茯苓总黄酮解重金属铅毒性研究

2.3.1 造模、分组及给药 将 60 只雄性昆明种小鼠随机分为空白组、模型组和土茯苓总黄酮高、中、低剂量 (9、6、3 g/kg) 组, 空白组小鼠饮用超纯水, 其余组自由饮用含铅水溶液 (0.9 mg/mL) 30 d, 建立慢性铅中毒模型。铅中毒模型建立后, 各给药组 ig 药物 (10 mL/kg), 空白组和模型组 ig 0.9%氯化

钠溶液, 1 次/d, 连续 30 d。末次给药后, 禁食不禁水 24 h。

2.3.2 血液及肝、肾组织中铅含量的测定 按“2.2.2”项下方法测定。

2.3.3 生化指标的测定 每组中用于铅含量测定后剩余的 6 只小鼠摘眼球取血, 室温静置 30 min, 3000 r/min 离心, 取血清, 按照试剂盒说明书测定血清 AST、ALT 活性和 Cr、BUN 水平。

2.3.4 肝、肾组织病理切片观察 按“2.2.4”项下方法检测。

2.4 土茯苓总黄酮的成分分析及含量测定

依据文献和本课题组前期研究结果, 选取分离得到量大的黄酮化合物作为对照品, 进行土茯苓总黄酮的成分分析并测定主要成分的含量。

2.4.1 样品的制备

(1) 对照品溶液的制备: 精密称取新落新妇苷对照品 5.66 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 得新落新妇苷对照品储备液; 精密称取落新妇苷对照品 10.59 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 得落新妇苷对照品储备液; 精密称取花旗松素对照品 9.87 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 得花旗松素对照品储备液; 精密称取新异落新妇苷对照品 5.05 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 得新异落新妇苷对照品储备液; 精密称取异落新妇苷对照品 2.01 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 得异落新妇苷对照品储备液; 精密称取黄杞苷对照品 4.08 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 得黄杞苷对照品储备液。

(2) 混合对照品溶液的制备: 分取各对照品储备液适量, 置于同一 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 即得新落新妇苷、落新妇苷、花旗松素、新异落新妇苷、异落新妇苷、黄杞苷质量浓度分别为 90.56、169.44、157.92、80.80、32.16、65.28 µg/mL 的混合对照品溶液。

(3) 供试品溶液的制备: 精密称取土茯苓总黄酮干膏 35.0 mg, 甲醇溶解, 定容于 10 mL 量瓶中, 精密吸取 1 mL 溶液于 2 mL 量瓶中, 甲醇定容, 得 1.75 mg/mL 的供试品溶液。

2.4.2 成分分析 根据混合对照品溶液和供试品溶液的 HPLC 图谱, 对比分析土茯苓醋酸乙酯部位中总黄酮的主成分。色谱条件: SPODS-A 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 µm), 流动相为乙腈 (A)-0.1%甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~25 min, 15~20% A; 25~30 min, 20% A; 30~35 min, 20%~30% A;

35~45 min, 30%~100% A; 45~55 min, 100% A; 55~60 min, 15% A; 体积流量为 1 mL/min; 检测波长为 290 nm; 进样量为 10 μ L; 柱温为室温; 塔板理论数以落新妇苷峰计不少于 8000。

2.4.3 主要成分含量测定 采用外标两点法, 计算新落新妇苷、落新妇苷、花旗松素、新异落新妇苷、异落新妇苷、黄杞苷占总黄酮的量。色谱条件: SP ODS-A 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液 (18:82); 体积流量为 1 mL/min; 检测波长为 290 nm; 进样量为 10 μ L; 柱温为室温; 塔板理论数以落新妇苷峰计不少于 8000。

2.5 统计学分析

数据采用 SPSS 21.0 软件中的 ANOVA 程序进行单因素方差分析, 结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 土茯苓醋酸乙酯部位解重金属铅毒性研究

3.1.1 实验动物一般临床观察 小鼠染铅毒 2 d 后, 毛发偏黄无光泽且粗糙毛躁, 与空白组相比, 模型组小鼠对外界更为敏感, 易受刺激, 日常聚集成团, 饮食量减少, 体质量增长减缓。给予药物进行干预后, 各给药组小鼠铅中毒症状均有不同程度的改善。

3.1.2 各给药组对急性铅中毒小鼠血液、肝和肾组织铅含量的影响 如表 1 所示, 小鼠急性铅中毒后, 模型组小鼠血液铅含量超过 400 μ g/L, 提示造模成功, 同时与空白组相比, 小鼠体内肝、肾铅含量显著升高 ($P<0.05$)。与模型组相比, 土茯苓总提物组和土茯苓醋酸乙酯组小鼠血、肝、肾铅含量均显

著降低 ($P<0.05$)。与土茯苓总提物组相比, 土茯苓醋酸乙酯组小鼠血液中铅含量降低的程度与总提物相当, 差异没有显著性, 但小鼠肝、肾中的铅含量显著降低 ($P<0.05$)。结果表明, 土茯苓总提物组及土茯苓醋酸乙酯组均可降低小鼠体内铅含量, 且土茯苓醋酸乙酯组的效果优于土茯苓总提物组, 提示土茯苓中有效成分具有解铅毒的作用, 且多集中在醋酸乙酯部位, 故推测醋酸乙酯部位为解重金属铅毒的活性部位。

3.1.3 各给药组对急性铅中毒小鼠的血清生化指标水平的影响 如表 2 所示, 与空白组相比, 模型组小鼠血清 MDA 含量明显增加 ($P<0.05$), GSH-Px、SOD 活性明显降低 ($P<0.05$)。与模型组相比, 土茯苓总提物组和土茯苓醋酸乙酯组小鼠血清 MDA 含量有所降低 ($P<0.05$), GSH-Px、SOD 活性均有不同程度地升高 ($P<0.05$)。与土茯苓总提物组相比, 土茯苓醋酸乙酯组小鼠血清 MDA 含量有所降低 ($P<0.05$), GSH-Px、SOD 活性有所升高 ($P<0.05$)。结果表明, 土茯苓总提物组及土茯苓醋酸乙酯组对急性铅中毒小鼠均具有保护作用, 且土茯苓醋酸乙酯组的作用优于土茯苓总提物组。

3.1.4 各给药组对急性铅中毒小鼠肝、肾组织的病理损伤情况 肝脏肉眼可见模型组小鼠肝脏肿胀、粘连, 边缘钝圆, 颜色稍暗, 表面有大小不等的淡白色渗出物附着。其余各组未见异常。病理切片结果如图 1 所示, 空白组小鼠肝脏结构完整, 清晰, 肝细胞大小正常, 肝索在中央静脉周围呈放射状, 无异常改变。模型组小鼠肝脏损伤较为严重, 中央

表 1 土茯苓醋酸乙酯部位对急性铅中毒小鼠血液、肝、肾组织铅含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of ethyl acetate part of *Smilaxis Glabrae Rhizoma* on Pb contents in blood, liver and kidney tissues of mice with acute lead poisoning ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g $\cdot$ kg $^{-1}$)	血铅/(μ g $\cdot$ L $^{-1}$)	肝脏铅/(μ g $\cdot$ g $^{-1}$)	肾脏铅/(μ g $\cdot$ g $^{-1}$)
空白	—	49.48 $\pm$ 1.59	0.08 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.06
模型	—	429.03 $\pm$ 58.02*	14.43 $\pm$ 2.14*	30.60 $\pm$ 2.49*
土茯苓总提物	6	145.48 $\pm$ 34.32 $^{\Delta}$	7.22 $\pm$ 0.46 $^{\Delta}$	21.03 $\pm$ 0.19 $^{\Delta}$
土茯苓醋酸乙酯	6	103.72 $\pm$ 23.64 $^{\Delta}$	3.43 $\pm$ 0.51 $^{\Delta\#}$	12.43 $\pm$ 0.61 $^{\Delta\#}$

与空白组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: $^{\Delta}P<0.05$; 与土茯苓总提物组比较: $^{\#}P<0.05$, 表 2 同

* $P<0.05$ vs blank group; $^{\Delta}P<0.05$ vs model group; $^{\#}P<0.05$ vs total extract from *Smilaxis Glabrae Rhizoma* group, same as Table 2

表 2 土茯苓醋酸乙酯部位对急性铅中毒小鼠血清 MDA 水平及 SOD、GSH-Px 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of ethyl acetate part of *Smilaxis Glabrae Rhizoma* on MDA level and SOD, GSH-Px activities in serum of mice with acute lead poisoning ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g $\cdot$ kg $^{-1}$)	SOD/(U $\cdot$ mL $^{-1}$)	MDA/(nmol $\cdot$ mL $^{-1}$)	GSH-Px/(U $\cdot$ mL $^{-1}$)
空白	—	191.08 $\pm$ 2.63	1.23 $\pm$ 0.16	296.61 $\pm$ 14.83
模型	—	152.99 $\pm$ 1.79*	3.81 $\pm$ 0.31*	87.36 $\pm$ 9.28*
土茯苓总提物	6	168.29 $\pm$ 8.43 $^{\Delta}$	2.98 $\pm$ 0.12 $^{\Delta}$	154.16 $\pm$ 21.80 $^{\Delta}$
土茯苓醋酸乙酯	6	185.27 $\pm$ 1.28 $^{\Delta\#}$	1.85 $\pm$ 0.12 $^{\Delta\#}$	238.34 $\pm$ 37.94 $^{\Delta\#}$

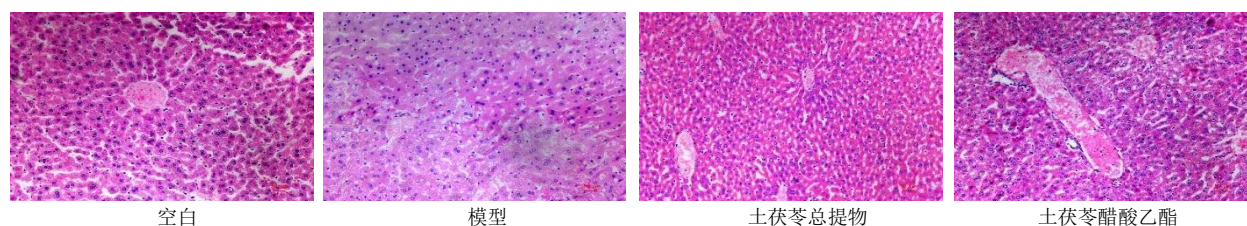


图 1 土茯苓醋酸乙酯部位对急性铅中毒小鼠肝脏病理变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effect of ethyl acetate part of *Smilacis Glabrae Rhizoma* on liver pathological changes of mice with acute lead poisoning (HE, ×200)

静脉旁有较多灰色沉积物，肝血窦增宽，淤血，肝细胞脂肪变性，部分细胞核固缩。各给药组小鼠肝损伤程度均有所改善，土茯苓总提取物组小鼠的肝小叶中央静脉扩张，细胞水肿，有少量点状坏死。土茯苓醋酸乙酯组小鼠肝小叶周围有少许淋巴细胞聚集，轻微嗜酸样变性。综上表明急性铅中毒对肝脏具有显著的损伤作用，同时推测土茯苓醋酸乙酯萃取部位有效成分对铅中毒所致的肝损伤具有一定的改善作用。

肾脏肉眼可见模型组小鼠肾脏颜色稍暗，表面有形状多样，大小不等的淡白色渗出物附着。其余各组小鼠肾脏肉眼未见异常。病理切片结果如图 2

所示，空白组肾小球、肾小管未见异常，肾血管无扩张充血。模型组小鼠近曲小管不规则，管腔严重扩张，小管细胞空泡变性，少量细胞脱落，细胞管型；肾小球增大，细胞间质水肿，有出血现象，炎性细胞浸润，纤维组织增生。各给药组小鼠肾损伤情况有不同程度改善，土茯苓总提取物组小鼠肾小管轻微扩张，少量炎性细胞浸润，细胞间质水肿。土茯苓醋酸乙酯组仍可见少量肾小管囊腔变大，周围肾小管疏松。综上表明急性铅中毒对肾脏具有显著的损伤作用，同时推测土茯苓醋酸乙酯萃取部位有效成分对急性铅中毒所致的肾损伤具有一定的改善作用。

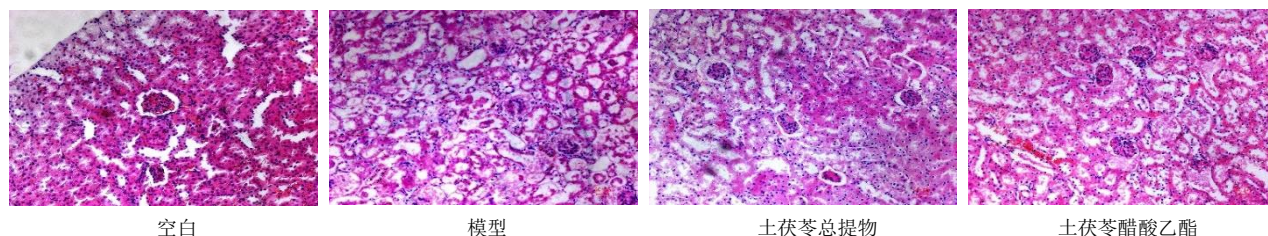


图 2 土茯苓醋酸乙酯部位对急性铅中毒小鼠肾脏病理变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 2 Effect of ethyl acetate part of *Smilacis Glabrae Rhizoma* on kidney pathological changes of mice with acute lead poisoning (HE, ×200)

3.2 土茯苓总黄酮解重金属铅毒性研究

3.2.1 实验动物一般临床观察 小鼠染铅毒初期，毛发粗糙、无光泽，活动更频繁，与空白组相比，模型组小鼠对外界更为敏感，易受刺激，日常聚集成团，易怒好斗，饮食量稍有减少，体质量增长减缓。给予药物进行干预后，各给药组小鼠铅中毒症状均有不同程度的改善。

3.2.2 各给药组对慢性铅中毒小鼠体质量的影响 如图 3 所示，与空白组比较，模型组小鼠体质量下降；给予药物进行干预后，各给药组小鼠中毒症状有不同程度改善，且体质量增长程度与正常组小鼠无显著差异。7 周后，小鼠体质量接近上限体质量，故体质量增长情况趋于平缓。

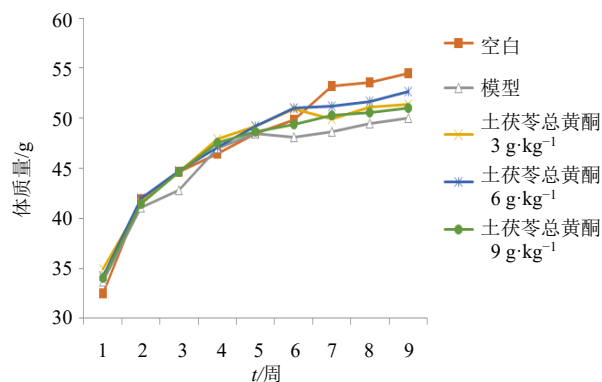


图 3 土茯苓总黄酮对慢性铅中毒小鼠体质量的影响

Fig. 3 Effect of total flavonoids from *Smilacis Glabrae Rhizoma* on body weight of mice with chronic lead poisoning

3.2.3 各给药组对慢性铅中毒小鼠血液和肝、肾组织铅含量的影响 如表 3 所示,小鼠慢性铅接触后,模型组小鼠血液铅含量超过 200 $\mu\text{g/L}$,提示造模成功,同时与空白组相比,模型组小鼠肝、肾铅含量显著升高 ($P<0.05$)。与模型组相比,土茯苓总黄酮低、中、高剂量组小鼠血、肝、肾铅含量显著降

低 ($P<0.05$),且呈剂量相关性。结果表明,土茯苓总黄酮可显著降低慢性铅中毒小鼠血、肝、肾铅含量,且土茯苓总黄酮高剂量组效果最优。

3.2.4 各给药组治疗慢性铅中毒小鼠后血清生化指标检测水平 如表 4 所示,与空白组相比,模型组小鼠血清 ALT、AST 活性显著升高 ($P<0.05$);

表 3 土茯苓总黄酮对慢性铅中毒小鼠血液、肝、肾组织铅含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of total flavonoids from *Smilacis Glabrae Rhizoma* on Pb contents in blood, liver and kidney tissues of mice with chronic lead poisoning ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	血铅/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	肝脏铅/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	肾脏铅/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
空白	—	13.01 $\pm$ 3.45	0.04 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.22
模型	—	265.78 $\pm$ 36.44*	0.28 $\pm$ 0.07*	1.14 $\pm$ 0.05*
土茯苓总黄酮	3	187.26 $\pm$ 23.84 [△] #	0.18 $\pm$ 0.05 [△]	0.83 $\pm$ 0.18 [△]
	6	138.94 $\pm$ 9.40 [△] #	0.16 $\pm$ 0.05 [△]	0.76 $\pm$ 0.16 [△]
	9	112.73 $\pm$ 9.61 [△]	0.11 $\pm$ 0.01 [△]	0.73 $\pm$ 0.23 [△]

与空白组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [△] $P<0.05$; 与土茯苓总黄酮 (9 g·kg⁻¹) 组比较: # $P<0.05$, 表 4 同

* $P<0.05$ vs blank group; [△] $P<0.05$ vs model group; # $P<0.05$ vs total flavonoids from *Smilacis Glabrae Rhizoma* (9 g·kg⁻¹) group, same as Table 4

表 4 土茯苓总黄酮对慢性铅中毒小鼠血清 ALT、AST 活性及 Cr、BUN 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of total flavonoids from *Smilacis Glabrae Rhizoma* on ALT, AST activities and Cr, BUN levels in serum of mice with chronic lead poisoning ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	Cr/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	BUN/(mmol·L ⁻¹)
空白	—	24.62 $\pm$ 2.79	39.74 $\pm$ 1.17	11.38 $\pm$ 1.45	5.94 $\pm$ 0.89
模型	—	44.20 $\pm$ 3.30*	58.63 $\pm$ 2.38*	19.35 $\pm$ 1.10*	11.32 $\pm$ 0.95*
土茯苓总黄酮	3	34.19 $\pm$ 11.23 [△] #	49.75 $\pm$ 1.39 [△] #	16.05 $\pm$ 1.63 [△] #	10.06 $\pm$ 0.39 [△] #
	6	25.87 $\pm$ 0.20 [△]	45.23 $\pm$ 1.81 [△] #	12.54 $\pm$ 1.40 [△]	9.68 $\pm$ 0.49 [△] #
	9	21.53 $\pm$ 3.81 [△]	40.23 $\pm$ 1.63 [△]	11.56 $\pm$ 0.57 [△]	7.21 $\pm$ 0.63 [△]

与模型组相比,各给药组小鼠血清 ALT、AST 活性均有不同程度地降低 ($P<0.05$);与土茯苓总黄酮高剂量组相比,土茯苓总黄酮中剂量组小鼠血清 ALT 活性与低剂量组 ALT、AST 活性均显著升高 ($P<0.05$)。结果表明,慢性铅接触会升高小鼠血清 ALT、AST 活性,损伤肝组织与功能,而土茯苓总黄酮类对铅诱导的肝损伤具有一定的修复作用,从而降低小鼠血清 ALT、AST 活性,且土茯苓总黄酮高剂量组效果最好。

与空白组相比,模型组小鼠血清 Cr、BUN 水平显著升高 ($P<0.05$);与模型组相比,各给药组小鼠血清 Cr、BUN 水平均有不同程度地降低 ($P<$

0.05);与土茯苓总黄酮高剂量组相比,土茯苓总黄酮中剂量组小鼠血清 BUN 水平与低剂量组 Cr、BUN 水平均显著升高 ($P<0.05$)。结果表明,慢性铅接触会升高小鼠血清 Cr、BUN 水平,损伤肾小球,降低肾脏代谢废物的能力,而土茯苓总黄酮对铅诱导小鼠肾脏具有一定的保护作用,且土茯苓总黄酮高剂量组保护效果最好。

3.2.5 各给药组对慢性铅中毒小鼠肝、肾组织的病理损伤情况 肝脏病理切片结果如图 4 所示,模型组小鼠肝脏损伤较为严重,肝细胞肿胀,细胞核固缩、溶解,肝细胞点状坏死,炎性细胞浸润,中央静脉扩张,有瘀血,门汇区周围密集的淋巴细胞浸

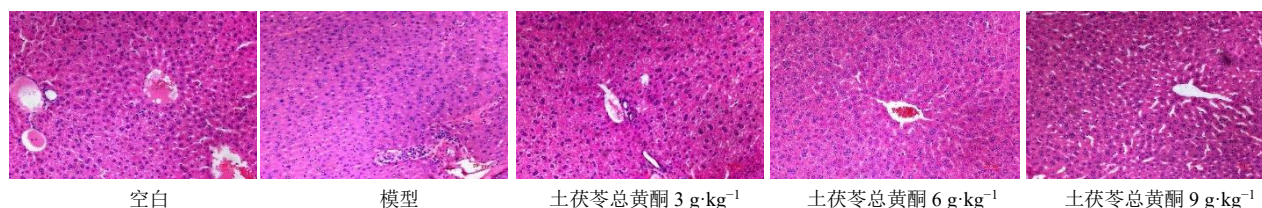


图 4 土茯苓总黄酮对慢性铅中毒小鼠肝脏病理变化的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 4 Effect of total flavonoids from *Smilacis Glabrae Rhizoma* on liver pathological changes of mice with chronic lead poisoning (HE, $\times 200$)

润。各给药组小鼠肝脏损伤程度均有所改善,其中土茯苓总黄酮高剂量组修复作用优于土茯苓总黄酮低、中剂量组,组织结构趋于正常,但仍可见少量点状坏死。综上表明慢性铅中毒对肝脏具有显著的损伤作用,同时土茯苓总黄酮对慢性铅中毒所致的肝损伤具有较好的改善作用。

肾脏病理切片结果如图 5 所示,模型组肾小球

囊腔明显变大,肾小管扩张,管腔不规则,肾小管上皮细胞有空泡,且灰色沉积物较多。各给药组小鼠肾脏损伤程度均有所改善,其中土茯苓总黄酮高剂量组修复作用优于土茯苓总黄酮低、中剂量组,组织结构接近正常,但仍可见瘀血。综上表明慢性铅中毒对肾脏具有显著的损伤作用,土茯苓总黄酮对慢性铅中毒所致的肾损伤具有较好的改善作用。

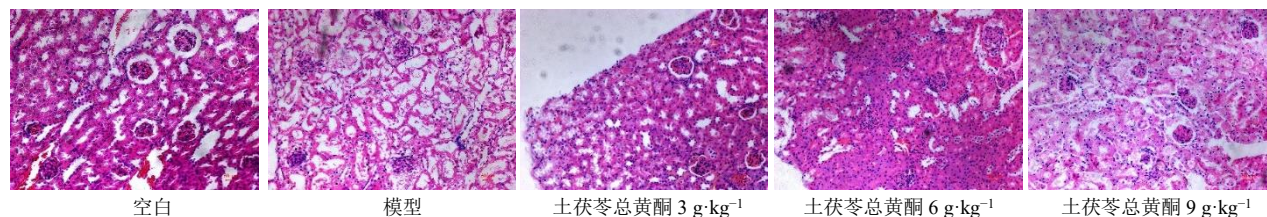


图 5 土茯苓总黄酮对慢性铅中毒小鼠肾脏病理变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 5 Effect of total flavonoids from *Smilacis Glabrae Rhizoma* on kidney pathological changes of mice with chronic lead poisoning (HE, ×200)

3.3 土茯苓总黄酮成分分析

3.3.1 主要成分特征图谱分析 根据混合对照品溶液和供试品溶液的特征图谱分析结果显示,土茯苓主要有 6 个特征共有峰,分别为新落新妇苷、落新妇苷、花旗松素、新异落新妇苷、异落新妇苷、黄杞苷 (图 6)。

3.3.2 土茯苓总黄酮 6 个主要成分的总含量 如表 5 所示,新落新妇苷、落新妇苷、花旗松素、新异落新妇苷、异落新妇苷、黄杞苷 6 个主要成分在土茯苓总黄酮中占 58.89%。

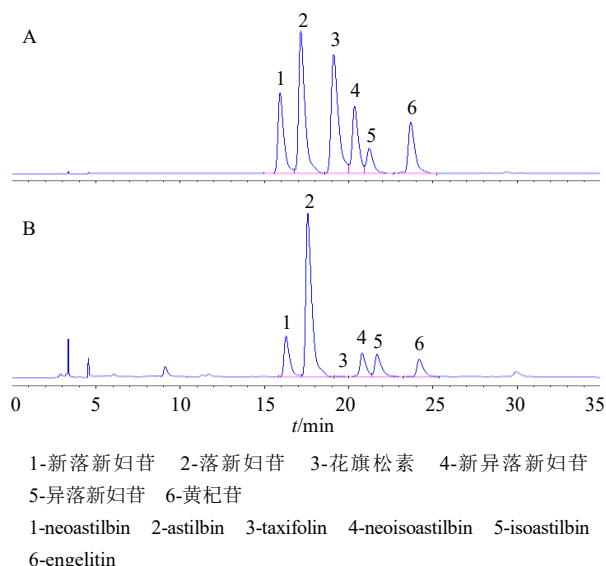


图 6 混合对照品 (A) 和土茯苓总黄酮供试品 (B) 溶液的 HPLC 图

Fig. 6 HPLC diagram of mixed standard solution (A) and total flavonoids from *Smilacis Glabrae Rhizoma* test solution (B)

表 5 土茯苓总黄酮中 6 个主要成分的含量

Table 5 Contents of six main components in total flavonoids from *Smilacis Glabrae Rhizoma*

成分	质量分数/%
新落新妇苷	8.20
落新妇苷	35.80
花旗松素	0.09
新异落新妇苷	5.19
异落新妇苷	5.46
黄杞苷	4.15
合计	58.89

4 讨论

本研究采用 ip 醋酸铅水溶液构建急性铅中毒小鼠模型,探究土茯苓醋酸乙酯萃取部位(中等极性)解重金属铅毒性作用。实验结果表明,重金属铅能够引起机体严重的过氧化损伤,产生大量的 MDA 等脂质过氧化物,损伤机体抗氧化系统,对肝、肾组织均具有严重的损伤作用。首先通过比较各组小鼠血液、肝脏和肾脏中的铅含量发现,模型组小鼠血铅含量高于 400 μg/L,表明急性铅中毒小鼠模型造模成功,同时与空白组小鼠相比,模型组小鼠肝、肾组织中的铅含量显著升高;与模型组小鼠相比,各给药组小鼠血液、肝脏及肾脏中的铅含量均显著降低,其中土茯苓醋酸乙酯组小鼠体内铅含量降低的程度更显著,提示土茯苓醋酸乙酯部位的有效成分具有良好的排铅作用。其次通过比较各组小鼠血清生化指标水平发现,各给药组小鼠血清 MDA 水平和 SOD、GSH-Px 活性趋于正常,其中土茯苓醋酸乙酯组小鼠效果显著,提示土茯苓总提物

及醋酸乙酯萃取物对急性铅中毒小鼠均具有保护作用,且醋酸乙酯萃取物的保护作用优于总提物。最后通过比较肝脏及肾脏病理组织切片发现,重金属铅对小鼠肝脏及肾脏均有显著的损伤作用,且对肾脏的损伤高于肝脏;土茯苓总提物及醋酸乙酯萃取物对于急性铅诱导的小鼠肝、肾组织损伤具有一定的修复作用。综上,急性铅中毒实验发现土茯苓解重金属铅毒性的有效萃取部位为醋酸乙酯部位。

结合本课题组前期研究结果^[13]可知,土茯苓醋酸乙酯萃取部位中黄酮类成分为其主要成分,推测总黄酮成分为解重金属铅毒性的有效部位。本研究采用自由饮用含铅水溶液(0.9 mg/mL) 30 d 建立慢性铅中毒小鼠排铅以及肝、肾功能的保护作用。结果表明,慢性铅接触会对小鼠的肝、肾造成功能性损伤,干扰机体正常运行,影响小鼠的生长发育。首先通过比较各组小鼠血液、肝脏和肾脏中的铅含量发现,模型组小鼠血铅含量超过 200 $\mu\text{g/L}$,提示慢性铅中毒小鼠模型造模成功,同时与空白组小鼠相比,模型组小鼠肝、肾组织中的铅含量显著升高;与模型组小鼠相比,土茯苓总黄酮组小鼠血液、肝脏及肾脏中的铅含量显著降低,且呈剂量相关性,表明土茯苓总黄酮类成分可显著降低慢性铅中毒小鼠血液、肝脏及肾脏中的铅含量,具有良好的排铅作用,且总黄酮高剂量组效果最优。其次通过比较各组小鼠血清生化指标水平发现,各给药组小鼠血清中 ALT、AST 活性和 Cr、BUN 水平趋于正常,其中总黄酮高剂量组效果显著,表明土茯苓总黄酮类成分对铅诱导的小鼠肝脏及肾脏损伤具有一定的保护作用,且总黄酮高剂量组的保护效果最好。最后通过比较肝脏及肾脏病理组织切片发现,重金属铅对小鼠肝脏及肾脏均有显著的损伤作用,且对肾脏的损伤高于肝脏,与急性铅中毒模型组表现相同;土茯苓总黄酮对于慢性铅诱导的小鼠肝、肾组织损伤具有一定的修复作用。因此,通过慢性铅中毒实验,可以初步阐明土茯苓解重金属铅毒性的物质基础为总黄酮类成分。利用 HPLC 法分析土茯苓总黄酮中的主要成分及含量,通过对比分析混合对照品和样品的特征图谱发现总黄酮中主要有 6 个特征共有峰,分别为新落新妇苷、落新妇苷、花旗松素、新异落新妇苷、异落新妇苷、黄杞苷,且上述 6 个

化合物的含量占总黄酮的 58.89%,由此推测它们可能是土茯苓解重金属铅毒性的物质基础。但其确切的作用机制及相关化合物的活性有待进一步研究,本课题组后期将对土茯苓解重金属铅毒性的有效成分进行更深入的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Saxena G, Flora S, Flora G. *Environmental Occurrence, Health Effects and Management of Lead Poisoning* [M]. Amsterdam: Elsevier, 2006: 158-228.
- [2] 于德娥,刘云儒,刘玉梅,等. 2007—2011 年中国儿童血铅水平及铅中毒率的分析 [J]. 现代预防医学, 2015, 42(1): 66-68.
- [3] 尤丽菊,刘国玲. 误服重金属(铅,汞,砷等)中毒及抢救的生化机制 [J]. 医学信息, 2011, 24(19): 6441-6442.
- [4] Cory-Slechta D A, Schaumburg H H. *Experimental and clinical neurotoxicology* [M]. New York: Oxford University Press, 2000: 708-720.
- [5] Finkelstein Y, Markowitz M E, Rosen J F. Low-level lead-induced neurotoxicity in children: An update on central nervous system effects [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 1998, 27(2): 168-176.
- [6] Flora S, Dhundasi S A. Metal poisoning: Threat and management [J]. *Al Ameen J Med Sci*, 2009, 2(2): 4-26.
- [7] 金鑫. 口服和肌肉注射二巯基丙磺酸钠驱汞效果的观察 [J]. 职业卫生与应急救援, 2000, 18(1): 15-16.
- [8] 郁东,徐旭东,周永田,等. HgCl_2 染毒大鼠的胥神经变性 [J]. 环境与健康杂志, 2006, 23(5): 409-412.
- [9] 郑捷,郑宇翔,肖凤霞,等. 土茯苓对急性汞中毒大鼠的保护作用研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(4): 163-166.
- [10] 盛凯. 银苓 I 号对铅中毒小鼠驱铅及非特异性免疫功能的影响 [D]. 西安: 第四军医大学, 2005.
- [11] 廖文. 砷和汞生物可给性及形态变化研究: 以食品为例 [D]. 北京: 中国科学院大学(中国科学院广州地球化学研究所), 2019.
- [12] Hua S Y, Zhang Y W, Liu J Y, et al. Ethnomedicine, phytochemistry and pharmacology of *Smilax glabra*: An important traditional Chinese medicine [J]. *Am J Chin Med*, 2018, 46(2): 261-297.
- [13] 程双,马圆媛,彭财英,等. 土茯苓乙酸乙酯有效部位的化学成分 [J]. 中药材, 2021, 4(1): 79-83.
- [14] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 41-42.

[责任编辑 李亚楠]