

· 毒理 ·

## 款冬花及其总生物碱的肝脏毒性

回连强, 高双荣, 刘婷\*, 李春英, 郝然, 易艳, 郭静, 贺蓉, 曹春雨, 赵雍, 梁爱华, 张毅  
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:对款冬花的肝脏毒性进行初步的研究探讨。方法:昆明种小鼠 ig 款冬花水煎液生药 20, 40 g·kg<sup>-1</sup>连续 4 周,测定血清丙氨酸氨基转移酶(ALT), 门冬氨酸氨基转移酶(AST)活性, 肝组织称重, 计算肝脏系数, 观察肝脏病变情况并评分;利用精密肝切片培养技术, 将款冬花水煎液 0.005, 0.05 g·L<sup>-1</sup>和总生物碱 0.5, 2.0 g·L<sup>-1</sup>与肝切片分别共同培养 24, 6 h 后, 制备肝组织匀浆, BCA 法测定匀浆液中蛋白含量, 连续监测法测定并计算每微克蛋白中 ALT, AST, 乳酸脱氢酶(LDH),  $\gamma$ -谷氨酰胺转移酶(GGT)的漏出率。结果:款冬花水煎液 40 g·kg<sup>-1</sup>ig 4 周后, 镜下观察雌性动物款冬花水煎液组与对照组比较有明显病理改变, 且伴有肝脏系数的明显增加;款冬花水煎液及总生物碱与肝切片共培养后, 水煎液 2 个剂量组均能引起 ALT 漏出率的显著升高;总生物碱 0.5 g·L<sup>-1</sup>组能引起肝切片 LDH, ALT 漏出率显著升高, 2.0 g·L<sup>-1</sup>组能引起肝切片 GGT 漏出率显著升高, 蛋白含量显著下降。结论:款冬花体内体外试验均显示出一定的肝脏毒性。

**[关键词]** 款冬花; 总生物碱; 肝脏毒性; 精密肝切片

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)04-0238-04

## Hepatotoxicity on Water Extracts and the Total Alkaloid of Farfarae Flos

HUI Lian-qiang, GAO Shuang-rong, LIU Ting\*, LI Chun-ying, HAO Ran, YI Yan,  
GUO Jing, HE Rong, CAO Chun-yu, ZHAO Yong, LIANG Ai-hua, ZHANG Yi

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the hepatotoxicity of Farfarae Flos. **Method:** KM mice were given the water extracts of Farfarae Flos orally in 20, 40 g·kg<sup>-1</sup> doses for successive 4 weeks, enzyme activity of aspartate transaminase(AST), alanine transaminase(ALT) in serum of mice were measured, coefficient of liver were calculated, and liver histopathology examination were conducted. Using the precision-cut slice technology, culture liver slices for 24 hours with water extracts in concentration 0.005, 0.05 g·L<sup>-1</sup> and 6 hours with the total alkaloid of Farfarae Flos in concentration 0.5, 2.0 g·L<sup>-1</sup>, the slice homogenate were prepared, protein concentration were detected by BCA protein assay method, enzyme activity of ALT, AST, lactate dehydrogenase(LDH),  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase(GGT) were detected by enzyme kinetics method and leakage were calculated. **Result:** The water extract of Farfarae Flos 40 g·kg<sup>-1</sup> dose group of female had significant histopathology changes and organ coefficient of liver increased compared with control group. After co-culture for 24 hours with water extracts of Farfarae Flos, ALT leakage were significantly increased in two groups; LDH and ALT leakage were significantly increased with final concentration 0.5 g·L<sup>-1</sup>, GGT leakage was significantly increased and protein content was obviously decreased with final concentration 2.0 g·L<sup>-1</sup> after co-culture for 6 hours with the total alkaloid of Farfarae Flos. **Conclusion:** Farfarae Flos displayed liver toxicity in some degree for *in vivo* and *in vitro* experiments.

**[收稿日期]** 2011-09-29

**[基金项目]** 国家科技部重大专项(2009ZX09301-005-08); 国际科技合作项目(2006DFA31760); 中国中医科学院自选课题(2006年度)

**[第一作者]** 回连强, 主管技师, Tel:010-84252805-2231, E-mail: huiq18@sina.com

**[通讯作者]** \* 刘婷, 副研究员, 从事中药药理和毒理学研究, Tel:010-84252805-2231, E-mail: lhtbit@163.com

[Key words] Farfarae Flos ; total alkaloid; hepatotoxicity; precision-cut liver slice

款冬花为菊科款冬属植物款冬 *Tussilago farfara* L. 的干燥花蕾,简称冬花。为常用中药材。但近年来研究发现,款冬花中含有肝毒吡咯里西啶生物碱(hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids, HPA),HPA 是目前已知最重要的植物性肝毒成分,可引起肝细胞出血性坏死,肝巨细胞症及静脉闭塞症等<sup>[1]</sup>,为此,WHO 专门制订了关于 HPA 的安全指南<sup>[2]</sup>。

面对日益彰显的中药肝脏的不良反应问题,迫切需要更为高效的中药临床前安全性评价方法与技术体系来研究中药的毒性问题。而介于器官与细胞水平之间的精密肝切片技术<sup>[3-4]</sup>融体内外检测技术优点于一身,简单、快速、经济,可阐明毒物代谢转化并预测药物毒性,而该技术在中药研究方面应用甚少。作者在前期对大鼠精密肝切片技术进行过培养条件的优化<sup>[5]</sup>,通过对切片厚度、培养基种类、培养温度、pH 等条件的探索,建立了一套精密肝切片培养技术。本研究基于该项技术,对款冬花总生物碱进行了体外肝脏毒性的观察,并对照进行了款冬花水煎液的小鼠体内肝脏毒性实验,以期较全面地评价款冬花的肝脏毒性并建立更为高效的中药临床前安全性评价方法,为中药肝毒性早期预警提供新的技术手段。

## 1 材料

**1.1 试剂** 青、链霉素(美国 HyClone 公司,批号 J090701),Waymouth's 培养液(美国 Gibco 公司,批号 561585),DMEM 培养液(美国 Gibco 公司,批号 1272041),牛血清白蛋白(科海军舟进口分装),Hepes(美国 Amresco 公司,批号 H8090),地塞米松(美国 Solarbio 公司,批号 D8040),琼脂糖(英国 Oxoid limited 公司,批号 LP0028A),乙醇胺(美国 Acros Organics 公司,批号 A0270368),转铁蛋白(Sigma 公司,批号 T3309),胎牛血清(美国 HyClone 公司,批号 gtb0060),门冬氨酸氨基转移酶(ALT,批号 090561,200906)、丙氨酸氨基转移酶(AST,批号 091151,200905)、乳酸脱氢酶(LDH,批号 090261,200908)、 $\gamma$ -谷氨酰胺转移酶试剂盒(GGT,批号 090421,200904)、均由中生北控生物科技有限公司提供,BCA 法蛋白分析试剂盒(美国 Pierce 公司,批号 IC110453)。

**1.2 药品** 款冬花水煎液及款冬花生物碱均由中国中医科学院中药所化学室提供。

**1.3 动物** 昆明种小鼠,雌雄各半,体重 18~22 g,

购自中国药品生物制品检定所实验动物中心,许可证号 SCXK(京)2005-0004。SD 大鼠,雄性,体重 180~200 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2007-0001。

**1.4 仪器** 1000 Plus Vibracome 振荡切片机(英国),Sartorius BSA 224S-CW 1/万分析天平(德国),Sapphire 600 全自动生化分析仪(爱尔兰),Humalyzer 2000 半自动生化分析仪(德国),Shandon Excelsior ES 全自动脱水机,Shandon Histocentre 3 石蜡包埋机、Shandon Finesse 325 切片机、Shandon Varistain Gemini 全自动染色机(英国),Olympus BX51 显微镜及图像分析系统(日本)。

## 2 方法

**2.1 药物提取** 款冬花水煎液:1 kg 款冬花加水煎煮 2 次,过滤,合并 2 次滤液浓缩至含生药 2.0 g·mL<sup>-1</sup>。款冬花总生物碱:1 kg 款冬花,90% 乙醇回流提取 3 次,每次 2 h,滤过,合并滤液,减压回收至无醇味。水液用 2.5% HCl 调 pH 至 2~3,CHCl<sub>3</sub> 萃取 3 次,弃去氯仿液。剩余水层用 5% NaOH 调 pH 至 10~11,CHCl<sub>3</sub> 萃取 3 次,回收氯仿得总生物碱 1 g,提取率为 0.1%。

**2.2 款冬花水煎液对小鼠的体内肝脏毒性实验** 昆明小鼠,体重 18~22 g,雌雄各半,分别按体重、性别随机分为正常对照组,款冬花水煎液含生药 20,40 g·kg<sup>-1</sup>组共 6 组,每组 5 只。ig,1 次/d,连续 4 周,末次药后禁食 16~20 h,小鼠眼眶采血,3 000 r·min<sup>-1</sup> 15 min 分离血清,半自动生化分析仪测定 ALT,AST 活力;取肝脏称质量,计算脏器指数;对肝脏组织行病理学检查,常规制片,HE 染色,根据本试验高剂量组动物肝脏出现病变的类型及程度制定病理诊断标准,进行病理评分,诊断标准自拟,见表 1。

表 1 肝脏病变的分级及诊断标准

评分	分级	肝脏病变描述
0	-	肝脏未见明显病变
1	+	部分肝小叶周边的肝细胞胞浆疏松化
2	++	大部分肝小叶周边的肝细胞胞浆疏松化,小胆管或肝静脉周围有灶状炎症细胞浸润
3	+++	弥漫性肝细胞肿胀,胞浆疏松化,个别汇管区存在肝板坏死灶,胆管周围有淋巴细胞浸润

**2.3 款冬花水煎液及总生物碱对大鼠精密肝切片体外肝毒性实验** 将 SD 大鼠断头处死,在无菌条

件下取出肝脏,按文献方法<sup>[5]</sup>制备肝切片。切片厚 200 μm, BPM 培养液, pH 6.8。将肝切片与含款冬花水煎液 0.005, 0.05 g·L<sup>-1</sup> (所能配制的最高质量浓度) 及含 0.5, 2.0 g·L<sup>-1</sup> (所能配制的最高质量浓度) 款冬花总生物碱的 BPM 培养液在 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中分别培养 24, 6 h 后, 全自动生化分析仪连续检测法测定上清液及 2% 肝切片匀浆中 ALT, AST, LDH, GGT 活性, BCA 蛋白分析法测定上述匀浆液中的蛋白含量, 按文献<sup>[5]</sup>方法计算每微克蛋白中 ALT, AST, LDH, GGT 的漏出率。

**2.4 统计学处理** 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 数据采用 SPSS 11.0 统计软件 ANOVA 进行多组比较, 方差齐性用 LSD 检验, 方差不齐用 Tamhane 检验; 病理评分结果采用非参数 Kruskal-Wallis H 检验进行多组比较, 若总体水平有差异, 则采用 Mann-Whitney U 检验进行两两比较。P < 0.05 为有统计学意义。

**3 结果**

**3.1 款冬花水煎液对小鼠血清 ALT, AST 活力的影响** 款冬花水煎液 40 g·kg<sup>-1</sup> 组, 雄性 AST, 雌性 ALT 与对照组比较有升高趋势, 但无统计学意义, 其余各给药组与对照组比较无明显差异。见表 2。

表 2 款冬花水煎液对小鼠血清 ALT, AST 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ ) U·L<sup>-1</sup>

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	性别	ALT	AST
对照	-	雄	54.04 ± 11.47	120.44 ± 8.57
款冬花	20	雄	59.96 ± 17.65	132.57 ± 22.82
		雌	57.48 ± 10.99	133.01 ± 12.14
对照	-	雌	53.15 ± 10.91	139.48 ± 10.28
		雄	53.50 ± 4.88	133.66 ± 16.67
款冬花	40	雌	64.27 ± 17.27	139.45 ± 12.51
		雄		

**3.2 款冬花水煎液对小鼠肝脏指数的影响** 款冬花水煎液 40 g·kg<sup>-1</sup> 组, 雌性动物肝脏系数较对照组明显增大 (P < 0.05), 其余各给药组与对照组比较均无统计学意义, 见表 3。

表 3 款冬花水煎液对小鼠肝脏指数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	性别	肝脏指数 /%
对照	-	雄	4.64 ± 0.48
款冬花水煎液	20	雄	5.10 ± 0.41
		雌	4.22 ± 0.75
		雄	4.30 ± 0.17
对照	-	雌	4.41 ± 0.42
		雄	4.73 ± 0.33 <sup>1)</sup>

注: 与对照组比较<sup>1)</sup> P < 0.05 (表 4, 5 同)。

**3.3 款冬花水煎液对小鼠肝脏组织形态学的影响** 对照组肝脏未见明显病变; 款冬花水煎液 20 g·

kg<sup>-1</sup> 组少数动物小叶周边肝细胞胞浆疏松淡染, 个别动物胆管周围有小灶状炎症, 与对照组比较未见明显差异; 40 g·kg<sup>-1</sup> 组大部分动物肝细胞呈不同程度疏松淡染, 肝窦狭窄, 部分汇管区小胆管或肝静脉周围可见小灶状炎症, 以淋巴细胞为主, 个别动物汇管区存在肝坏死灶, 其中雌性动物肝脏病变较雄性动物略重, 高剂量组与对照组比较有显著差异 (P < 0.05), 雄性动物与对照组比较未见明显差异。见表 4, 图 1。

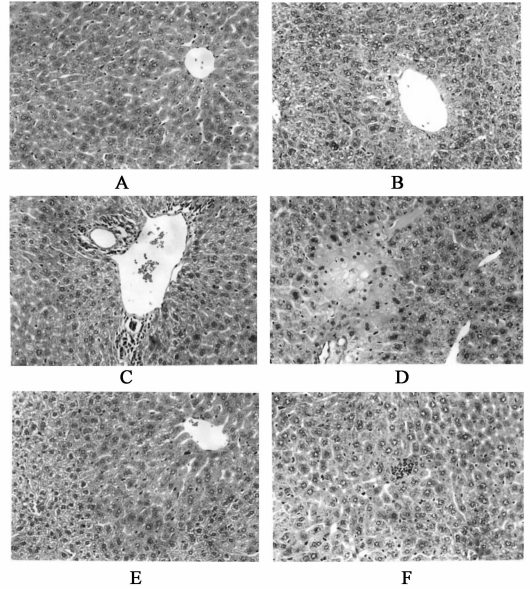


图 1 款冬花水煎剂对小鼠肝组织形态学的影响 (HE, ×400)  
A. 对照组; B-D. 款冬花水煎液 40 g·kg<sup>-1</sup> 组;  
E-F. 款冬花水煎液 20 g·kg<sup>-1</sup> 组

表 4 款冬花水煎液对小鼠肝脏组织形态学的影响-病变程度分级 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	性别	病变程度/只				病变评分
			-	+	++	+++	
对照	-	雄	5	0	0	0	0
		雌	5	0	0	0	0
款冬花水煎液	20	雄	4	1	0	0	0.2 ± 0.4
		雌	3	1	1	0	0.6 ± 0.9
	40	雄	2	2	1	0	0.8 ± 0.8
		雌	1	1	2	1	1.1 ± 1.1 <sup>1)</sup>

**3.4 款冬花水煎液及总生物碱对大鼠精密肝切片 LDH, AST, ALT, GGT 漏出率的影响** 款冬花水煎液 0.005, 0.05 g·L<sup>-1</sup> 与肝切片共培养 24 h 后, 均能引起 ALT 的显著升高, 与对照组有显著差异 (P < 0.001); 总生物碱 0.5, 2.0 g·L<sup>-1</sup> 与肝切片共培养 6

h后,0.5 g·L<sup>-1</sup>组能引起肝切片 LDH,ALT 漏出率的显著升高( $P < 0.05$ ),2.0 g·L<sup>-1</sup>组能引起肝切片 GGT 漏出率显著升高( $P < 0.05$ )、蛋白含量显著下

降( $P < 0.05$ );且各项指标均显示出一定的毒效关系;对 AST 漏出率有升高趋势,但无统计学意义。见表 5。

表 5 款冬花水煎液及总生物碱对培养 24,6 h 精密肝切片 LDH,AST,ALT,GGT 漏出率及蛋白含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量 /g·L <sup>-1</sup>	培养时间 /h	LDH /%/μg	AST /%/μg	ALT /%/μg	GGT /%/μg	Prot /mg·L <sup>-1</sup>
对照	-	24	2.77 ± 0.20	0.47 ± 0.07	0.64 ± 0.09	1.48 ± 0.25	341.31 ± 20.82
款冬花水煎液	0.005	24	2.55 ± 0.32	0.56 ± 0.07	1.30 ± 0.21 <sup>2)</sup>	1.43 ± 0.40	371.03 ± 48.84
	0.05	24	1.77 ± 0.18	0.36 ± 0.06	1.40 ± 0.16 <sup>2)</sup>	0.73 ± 0.15	506.03 ± 45.46
对照	-	6	0.08 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01	5 884.00 ± 374.03
款冬花生物碱	0.5	6	0.14 ± 0.01 <sup>1)</sup>	0.03 ± 0.01	0.09 ± 0.01 <sup>1)</sup>	0.04 ± 0.00	4 880.67 ± 261.02
	2.0	6	0.16 ± 0.07	0.04 ± 0.01	0.11 ± 0.05	0.09 ± 0.02 <sup>1)</sup>	4 277.33 ± 853.37 <sup>1)</sup>

注:与对照组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

现代药理研究证明款冬花具有明显的镇咳祛痰、抗炎、止泻等多样生物活性,使其在临床上的应用日益广泛<sup>[6-7]</sup>。但有关款冬花毒性方面的研究较少,有实验表明款冬花对小鼠的 LD<sub>50</sub>分别为:煎剂 ig 为生药 124 g·kg<sup>-1</sup>,醇提液 ig 为生药 112 g·kg<sup>-1</sup>,醚提物为 ip 生药 43 g·kg<sup>-1</sup><sup>[8]</sup>。近年来研究发现款冬花总生物碱提取物 10 g·kg<sup>-1</sup>表现出一定的肝脏毒性,主要表现为动物体重的下降,AST 水平升高和肝脏病理组织形态学的改变,而同等剂量的水煎液未表现出肝脏毒性。一般研究认为款冬花按照其传统的用量(5~9) g·d<sup>-1</sup>和用法(水煎)入药是安全的,没有明显的肝脏毒性<sup>[9]</sup>。

作者曾检测款冬花水煎液小鼠 LD<sub>50</sub>为生药 172.37 g·kg<sup>-1</sup>。本研究中用约 1/4 和 1/8 LD<sub>50</sub>(按 60 kg 的人计算,分别为临床最大剂量 15 g·d<sup>-1</sup>的 160 倍和 80 倍)的款冬花水煎液给小鼠 ig 4 周,未见 ALT,AST 的明显升高,镜下观察发现一定的病理改变,雌性动物肝脏病变较雄性动物略重,且伴有肝脏指数的增大,说明款冬花水煎液显示出一定的肝脏损伤,但损伤不明显,与一般文献报道相符。但考虑到款冬花临床应用时,以儿童居多,其潜在的肝损伤问题仍不容忽视,我们进一步利用精密肝切片培养技术对其水煎液和总生物碱进行了体外肝毒性实验。

利用精密肝切片技术对款冬花水煎液及总生物碱进行肝脏毒性的研究表明,款冬花水煎液 0.005,0.05 g·L<sup>-1</sup>与肝切片共培养 24 h 后,能引起 ALT 的显著升高,总生物碱 0.5 g·L<sup>-1</sup>与肝切片共培养 6 h 后,可引起 LDH,ALT 漏出率的增加,而 2.0 g·L<sup>-1</sup>组则表现为 GGT 漏出率的增加及蛋白含量的下降,

表现出一定的肝脏毒性。与体内试验相比,精密肝切片培养表现出简单、快速、经济的特点,在更低的剂量(款冬花水煎液 0.005 g·L<sup>-1</sup>),更短的作用时间(24 h)即显示出一定的肝脏损伤,可以作为一种新的快速敏感的技术手段用于药物肝毒性早期预警的实验研究。

#### [参考文献]

- [1] 赵显果,王峥涛,张勉,等. 肝毒吡咯里西啶生物碱与中草药[J]. 中草药,1998,29(5):343.
- [2] Robins D J. Pyrrolizidine alkaloids[J]. Nat Prod Rep, 1995,12(4):413
- [3] Carole Lerche-Langrand, Herve J Toutain. Precision-cut liver slices; characteristics and use for *in vitro* pharmacotoxicology[J]. Toxicology, 2000,153:221.
- [4] Delzenne M. Precision-cut liver slices in culture as a tool to assess the physiological involvement of Kupffer cells in hepatic metabolism[J]. Comparative Hepatology, 2004, 3(Suppl 1):S45.
- [5] 回连强,高双荣,刘婷,等. 基于精密肝切片技术的野百合碱体外肝毒性初步研究[J]. 中国中药杂志, 2011,36(5):45.
- [6] 高慧琴,马骏,林湘,等. 栽培品款冬花止咳化痰作用研究[J]. 甘肃中医学院学报,2001,18(4):20.
- [7] 张明发,沈雅琴,王红武,等. 辛温(热)合归脾胃经中药药性研究Ⅲ——抗炎作用[J]. 中药药理与临床, 1998,14(6):12.
- [8] Li Y P, Wang Y M. Evaluation of tussilagone: a cardiovascular respiratory stimulant isolated from Chinese herbal medicine[J]. Gen Pharmacol,1988,19(2):261.
- [9] 张燕,黄芳,吴笛. 款冬花及其所含生物碱对小鼠肝脏毒性作用的研究[J]. 时珍国医国药,2008(8):16.

[责任编辑 何伟]