

土三七小鼠半数致死量测定及大鼠肝、肾脏毒性实验研究

方军伟¹, 张国华¹, 方明笋², 滕显木¹, 张智勤¹, 潘锦辉¹, 寿旗扬², 陈民利²

1. 仙居县中医院消化内科, 浙江 台州 317300; 2. 浙江中医药大学动物实验研究中心, 浙江 杭州 310053

[摘要] 目的: 通过小鼠半数致死量测定和大鼠亚慢性毒性实验观察土三七毒性反应。方法: 实验①: 取 100 只 ICR 小鼠, 雌雄各半, 分为 1 组 (196 g/kg)、2 组 (231 g/kg)、3 组 (272 g/kg)、4 组 (320 g/kg) 和 0 组 (空白对照组), 每组各 20 只, 连续观察 14 天, 记录各组小鼠死亡数, 计算土三七半数致死量。实验②: 取 60 只 SD 大鼠, 雌雄各半, 分成 5 组, 空白对照组 (K 组)、土三七低 (L 组)、中 (M 组)、高 (H 组) 剂量组, 分别给予 5、10、20 g/kg 土三七, 分别相当于临床用量的 5、10、20 倍和三七组 (10 g/kg 三七), 每组 12 只, 连续给药 4 周, 观察土三七对大鼠肝肾功能和肝、脾、肾系数的影响, 并进行肝功能检测谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、总胆红素 (TBil)、碱性磷酸酶 (ALP), 肾功能检测血尿素氮 (BUN)、肌酐 (Cr)、总蛋白 (TP)、尿微量白蛋白 (U-mAlb), 进行肝、肾病理组织学观察。结果: 1 组有 2 只小鼠死亡, 2 组有 12 只小鼠死亡, 3 组有 14 只小鼠死亡, 4 组有 19 只小鼠死亡。土三七的小鼠 LD₅₀ 为 235.0 g/kg, LD₅ 为 163.3 g/kg, LD₀₅ 为 338.1 g/kg。与 K 组比较, H 组大鼠肝重量显著降低 ($P < 0.05$), L、M、H 组大鼠脾重量和脾指数均显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而肾指数均显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。连续给 5、10、20 g/kg 土三七和 10 g/kg 三七 4 周后, 与 K 组比较, L、M、H 组大鼠血清 ALT 和 AST 均显著大幅度升高 ($P < 0.01$); M、H 组大鼠血清 TBil 和 ALP 均显著升高 ($P < 0.01$), 而 L 组大鼠血清 TBil 和 ALP 有升高的趋势 ($P > 0.05$), 与 K 组比较, L、M、H 组大鼠血清 ALT 和 AST 均显著大幅度升高 ($P < 0.01$); M、H 组大鼠血清 TBil 和 ALP 均显著升高 ($P < 0.01$), 而 L 组大鼠血清 TBil 和 ALP 有升高的趋势 ($P > 0.05$)。肝脏严重病变及淋巴细胞浸润, 肾脏肾小球体积轻度增大, 髓质部局部中性粒细胞浸润。结论: 大小鼠大剂量给予土三七后, 可导致肝、肠、胰腺等脏器的明显病变, 大鼠在相当于临床用量 5 倍时表现出轻微毒性, 而在给予 20 g/kg 土三七时出现大鼠死亡现象, 为临床用药提供了一定的剂量参考。

[关键词] 土三七; 肝毒性; 肾毒性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 12-0202-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.12.095

土三七(*Gynura segetum*)为菊科植物菊叶三七的根茎及全株, 该药有散瘀止痛、解毒消肿和补气摄血的功效; 因此常用于治疗跌打损伤、创伤出血、吐血、产后血气痛、痈疔疮疡、蛇咬伤等^[1-2], 常有较好的疗效。但近年来已有多起因服用土三七导致肝损害的报道, 由于其可导致肝小静脉闭塞综合征, 因而越来越受到人们的重视^[3]。笔者在临床中常见患者误食土三七中毒的发生。因此本实验通过小鼠急性毒性实验和大鼠亚慢性毒性实验对土三七毒性进行观察。

1 材料与方法

1.1 小鼠急性毒性实验^[4] 取 SPF 级 ICR 小鼠 100 只, 雌雄各半, 分别按体重随机分成 1 组(196 g/kg)、2 组(231 g/kg)、3 组(272 g/kg)、4 组(320 g/kg)和 0 组(空白对照组), 其中空白对照组给予蒸馏水, 各组均为 20 只, 雌雄各 10 只。给药前禁食不禁水 12 h。各剂量组小鼠分 2 次灌胃给药, 具体给药情

况见表 1。给药后即刻观察小鼠的反应情况, 包括小鼠外观、行为活动、精神状态、食欲、大小便及其颜色、皮毛、鼻、眼、口有无异常分泌物以及死亡情况, 死亡动物及时尸检, 肉眼观察有无病变脏器。并给药第 1 天每隔 30 min 观察 1 次, 以后每天观察 1 次, 连续观察 14 天, 记录动物毒性反应、体重变化及死亡分布情况。以体重变化、反应及死亡情况, 综合评价试验结果。试验结束, 处死所有小鼠, 剖检作肉眼观察, 若肉眼观察有病变脏器, 以一般反应、体重、死亡综合评价。结果用 Bliss 法计算土三七的小鼠口服 LD₅₀ 值。

1.2 大鼠亚慢性毒性实验^[4] 取 60 只 SPF 级 SD 大鼠, 雌雄各 30 只, 按体重均匀分成空白对照组(K 组)、土三七低(L 组)、中(M 组)、高(H 组)剂量组(5、10、20 g/kg 土三七, 分别相当于临床用量的 5、10、20 倍)和三七组(10 g/kg 三七, S 组), 每组 12 只, 雌雄各半。实验前适应 4 天, 实验期间, 每天上

[收稿日期] 2014-06-12

[基金项目] 浙江省仙居县社会科学项目 (编号: 2009C02)

[作者简介] 方军伟 (1972-), 男, 副主任医师, 研究方向: 肝小静脉闭塞病的相关研究、脂肪性肝病的相关研究、食道-胃的微创治疗。

表1 土三七(4.0 g 生药/mL)给药情况 mL/10g

组别	给药容积	
	0 h	3 h
0 组	0.40	0.40
1 组	0.40	0.09
2 组	0.40	0.18
3 组	0.40	0.28
4 组	0.40	0.40

午9~10点时间段灌胃给药,观察大鼠的行为活动、摄食、饮水、粪便、体重等情况,连续给药4周。给药4周时,各组大鼠用3%戊巴比妥钠麻醉,心脏取血,离心取血清,进行肝功能检测谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总胆红素(TBil)、碱性磷酸酶(ALP),肾功能检测血尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、总蛋白(TP)、微量白蛋白(U-mAlb)。并大体解剖观察,测定肝、脾、肾系数,进行肝、肾病理组织学观察。

1.3 统计学方法 小鼠急性毒性实验数据用DAS药学统计软件统计,用Bliss法计算半数致死量(LD₅₀)、LD₅₀(Fisher校正)95%的可信限、5%致死量(LD₅)和95%致死量(LD₉₅)。用SPSS11.5软件进行统计分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,应用t检验。

2 结果

2.1 土三七小鼠急性毒性动物死亡情况 见表2。各试药组小鼠给药后,出现自发活动、探究、梳理毛发、运动明显减少,毛发稀疏,给药后24h,腹部鼓胀,各组均有小鼠死亡,腹腔穿刺可见透明腹水,解剖发现腹腔中有大量腹水,肠管呈飘浮状,肠道大网膜有明显炎症渗出,呈胶冻状,小鼠进食量明显减少,肠道胀气和充血水,肝脏明显充血和肿胀,质硬,边缘钝,表面有颗粒感,胆囊胆汁中有隐血现象,脾脏肿大异常,胰腺呈白色分散状。1组有2只小鼠死亡,2组有12只小鼠死亡,3组有14只小鼠死亡,4组有19只小鼠死亡。试验14天结束后,处死所有各组小鼠解剖观察,未发现有病变脏器。土三七小鼠半数致死量、LD₅₀95%的可信限、LD₅和LD₉₅用Bliss法计算得结果,小鼠灌胃给予土三七的LD₅₀为235.0g生药/kg,LD₅₀的95%可信限为219.7~251.3g生药/kg,LD₅为163.3g/kg,LD₉₅为338.1g/kg。

表2 土三七小鼠急性毒性动物死亡情况 只

组别	死亡数	未死亡数	总数
0 组	0	20	20
1 组	2	18	20
2 组	12	8	20
3 组	14	6	20
4 组	19	1	20
总数	47	53	100

2.2 土三七和三七对正常大鼠脏器重量和指数影响的比较 见表3。连续给予5、10、20g/kg土三七和10g/kg三七4周后,在给药21天时,一只H组雌性大鼠死亡,与K组比较,H组大鼠肝重量显著降低($P < 0.05$),而肝指数无变化($P > 0.05$);L、M、H组大鼠脾重量和脾指数均显著增加($P < 0.05$, $P < 0.01$);L、M、H剂量组大鼠肾重量无明显变化($P > 0.05$),而肾指数均显著增加($P < 0.05$, $P < 0.01$);S组在给药期间脏器重量和脏器指数均无明显变化($P > 0.05$)。

表3 土三七和三七对正常大鼠脏器重量和指数影响的比较($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	肝脏重量(g)	脾脏重量(g)	肾脏重量(g)	肝脏指数(g/kg)	脾脏指数(g/kg)	肾脏指数(g/kg)
K组	8.9±1.95	0.8±0.24	1.8±0.22	36.9±5.73	3.5±0.72	7.8±1.31
L组	9.0±2.43	1.1±0.29	1.9±0.43	40.7±3.13	5.0±0.62	8.9±0.20
M组	8.2±2.20	1.1±0.33	1.8±0.26	38.4±2.82	5.6±1.61	8.9±1.58
H组	7.2±1.35	1.3±0.52	1.9±0.52	40.7±2.20	7.2±1.92	10.9±2.20
S组	8.6±1.50	0.8±0.21	1.9±0.36	35.9±2.08	3.5±0.55	8.1±0.54

与K组比较,① $P < 0.05$,② $P < 0.01$

2.3 土三七和三七对正常大鼠血清肝功能指标影响的比较 见表4。连续给5、10、20g/kg土三七和10g/kg三七4周后,与K组比较,L、M、H组大鼠血清ALT和AST均显著大幅度升高($P < 0.01$);M、H组大鼠血清TBil和ALP均显著升高($P < 0.01$),而L组大鼠血清TBil和ALP有升高的趋势($P > 0.05$)。

表4 土三七和三七对正常大鼠血清肝功能指标影响的比较($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

给药时间	组别	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	TBil(μ mol/L)	ALP(IU/L)
给药4周	K组	30.2±4.09	106.6±19.67	1.6±0.17	218.5±67.06
	L组	74.5±23.04	180.3±47.73	1.8±0.81	246.3±31.97
	M组	97.3±30.19	230.4±82.69	4.4±3.64	499.1±97.79
	H组	412.0±319.06	975.5±522.23	32.8±22.96	456.4±198.82
	S组	29.0±4.44	113.0±15.60	1.6±0.26	238.6±85.25

与K组比较,① $P < 0.05$,② $P < 0.01$

2.4 土三七和三七对正常大鼠血清肾功能指标影响的比较 见表5。与K组比较,连续给予5、10、20g/kg土三七和10g/kg三七4周后和M、H组在给药4周时大鼠血清BUN水平显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);L、M、H组在给药4周时大鼠血清Cr、TP和U-mAlb水平均显著降低($P < 0.01$);三七组在给药期间大鼠血清肾功能指标和蛋白含量无明显变化($P > 0.05$)。

2.5 肝脏、脾脏和肾脏组织病理学观察

2.5.1 肝脏组织病理学观察 K组和S组肝脏结构清晰,肝细胞排列整齐,可见中央静脉,肝细胞形态正常,胞核呈蓝色或淡蓝色,胞浆丰富,染成红色或淡粉色,可见肝窦,肝脏汇

管区结构正常,未见炎症细胞浸润(见图 1-A、见图 1-E);L 组中有 3 只大鼠肝脏散在少量淋巴细胞浸润,1 只大鼠肝脏一处点状坏死(见图 1-B);M 组局部肝细胞轻度浊肿,少量肝细胞核固缩、深染,胞浆强势酸性红染,肝窦轻度扩张充血,其中有 3 只大鼠肝脏可见肝细胞点状坏死(见图 1-C);H 组肝脏大量充血,肝窦融合,充满大量血细胞,大量肝细胞空泡样变,局部淋巴细胞浸润,部分肝细胞核固缩、深染,胞浆强势酸性红染,其中 1 只大鼠肝脏出血严重,可见大片无结构坏死区(见图 1-D)。

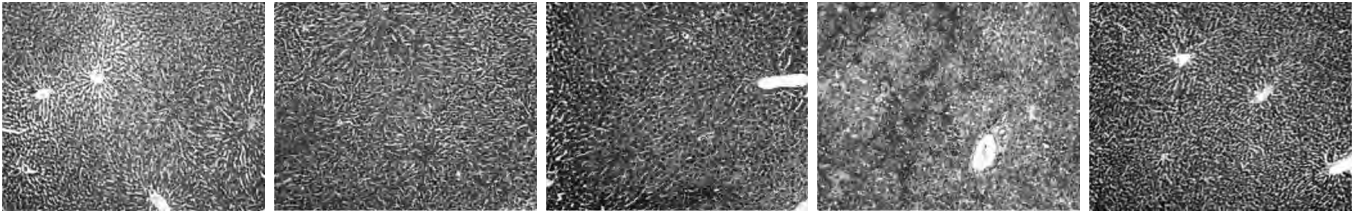


图 1-A 空白对照组 HE×100 图 1-B 低剂量组 HE×100 图 1-C 中剂量组 HE×100 图 1-D 高剂量组 HE×100 图 1-E 三七组 HE×100
图 1 肝脏组织病理学观察

2.5.2 肾脏组织病理学观察 K 组肾被膜、皮质、髓质结构清晰,皮质部肾小体和肾小管结构完好,髓质部可见大量开口于肾盂的乳头管(见图 2-A);L 组肾髓质部局部中性粒细胞浸润,可见大量开口于肾盂的乳头管(见图 2-B);M 组肾小球体积轻度增大,髓质部局部中性粒细胞浸润,可见大量开口于肾

表 5 土三七和三七对正常大鼠血清肾功能指标影响的比较($\bar{x} \pm s, n=12$)

给药时间	组别	BUN(mmol/L)	Cr(μ mol/L)	TP(g/L)	U-mAlb(g/L)
	K 组	6.8±1.46	44.2±2.53	56.7±3.68	31.0±1.95
	L 组	7.1±1.16	41.4±3.26	53.9±2.04	29.4±1.11
给药 4 周	M 组	8.2±1.51	41.4±2.64	53.4±3.61	27.7±1.44
	H 组	10.2±2.33	33.1±5.72	39.2±10.47	19.8±4.58
	S 组	8.5±3.05	45.6±6.89	57.0±2.47	30.6±1.03

与 K 组比较, ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$

盂的乳头管(见图 2-C);土 H 组肾小球体积轻度增大,髓质部局部中性粒细胞浸润,可见大量开口于肾盂的乳头管。其中 1 只大鼠肾小球体积增大,局部肾小管上皮脱落,淋巴细胞广泛浸润(见图 2-D);S 组肾髓质部局部中性粒细胞浸润,可见大量开口于肾盂的乳头管(见图 2-E)。

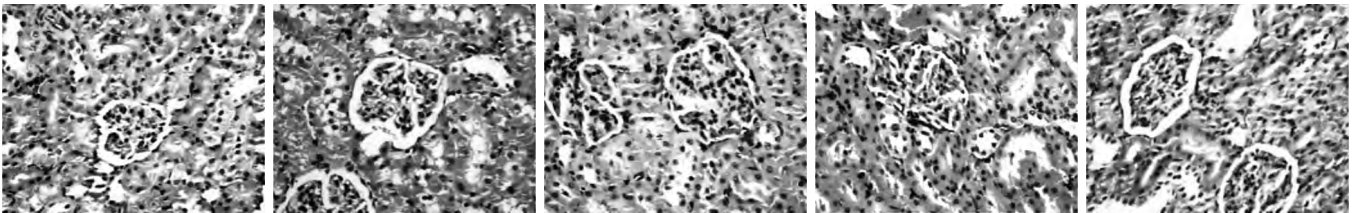


图 2-A 空白对照组 HE×400 图 2-B 低剂量组 HE×400 图 2-C 中剂量组 HE×400 图 2-D 高剂量组 HE×400 图 2-E 三七组 HE×400
图 2 肾脏组织病理学观察

3 讨论

急性毒性试验表明,小鼠给药后 24h,腹部膨隆,出现死亡,腹部大量腹水,肠、肝、胆囊、脾和胰腺有较明显的病变,土三七的小鼠 LD_{50} 为 235.0 g 生药/kg, LD_{50} 的 95% 可信限为 219.7~251.3 g 生药/kg, LD_5 为 163.3 g/kg, LD_{95} 为 338.1 g/kg。大鼠亚慢性毒性实验证明,大鼠灌胃 20 g/kg 土三七(相当于临床用量 20 倍)4 周后,大鼠肝脏重量降低,而肝脏指数无明显变化及脾脏重量增加,大鼠血清 ALT 和 AST 均显著大幅度升高;血清 TBil 和 ALP 均显著升高,血清 BUN 水平显著升高,血清 Cr、TP 和 U-mAlb 均显著降低。H 组肝脏病变严重,淋巴细胞浸润,肝细胞核固缩、深染,胞浆强势酸性红染,且可见大片无结构坏死区。肾脏肾小球体积轻度增大,髓质部局部中性粒细胞浸润,可见大量开口于肾盂的乳头管,局部肾小管上皮脱落,淋巴细胞广泛浸润。说明了大小鼠过量给予土三七后,能导致肝脏、肠道、胰腺等脏器的明显病

变,大鼠在相当于临床用量 5 倍时(5 g/kg 土三七)表现出轻微毒性,而在 20 g/kg 土三七时出现大鼠死亡现象,以上土三七毒性实验结果为临床用药提供了一定的剂量参考。

[参考文献]

- [1] 王强,鲁重美,郭涛.含吡咯烷生物碱的中草药与肝小静脉闭塞病[J].临床消化病杂志,2008,20(1):22-25.
- [2] 汪月娥,王诚杰.土三七与肝小静脉闭塞症[J].肝脏,2009,14(5):420-422.
- [3] 钟岚,张一.土三七所致肝小静脉闭塞病 142 例治疗的临床分析[J].医学与哲学,2012,33(5B):38-40.
- [4] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,1991.

(责任编辑:马力)