

马钱子超微粉毒性质反应量效关系研究

王宇红^{1,2*} 杨 蕙¹ 莫韦皓² 杨 琰¹ 张秀丽¹

(1. 湖南中医药大学湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地,

湖南省长沙市雨花区韶山中路 95 号, 410007; 2. 湖南中医药大学第一附属医院)

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目(09JJ3055); 湖南省科技厅资助项目(20107D2004)

* 通讯作者: wyh107@126.com, (0731)85369061

[摘要] 目的 比较马钱子超微粉与粗粉对小鼠毒性质反应量效关系的差异。方法 采用急性毒性试验与连续给药 7 天的重复给药毒性试验, 以死亡率为质反应阳性数, 以半数致死剂量(LD_{50})、最小致死剂量($MLDL_{D_1}$)、最大耐受剂量($MTDL_{D_0}$)为考察指标, 观察微粉化对制马钱子质反应量效、时效关系的影响。结果 马钱子超微粉致雄鼠的 LD_{50} 、 $MLDL_{D_1}$ 、 $MTDL_{D_0}$ 依次为 194.7、100、85 mg/kg, 雌鼠的依次为 163.0、85、70 mg/kg; 马钱子粗粉致雄鼠的 LD_{50} 、 $MLDL_{D_1}$ 、 $MTDL_{D_0}$ 依次为 295.7、115、100 mg/kg, 雌鼠的依次为 271.8、100、85 mg/kg。随着剂量的增加, 马钱子超微粉较粗粉致小鼠死亡潜伏期缩短更快。结论 马钱子超微粉及粗粉对小鼠的毒性反应相似, 其急性毒性存在剂量依赖性的时反应量效关系, 微粉化后其致死质反应急性毒性与重复给药毒性明显增强。

[关键词] 马钱子超微粉; 半数致死量; 最小致死剂量; 最大耐受剂量

Dose-Effect Relationship in the Toxicity Qualitative Response of Strychni Semen Ultrafine Powder

WANG Yuhong^{1,2}, YANG Hui¹, MO Weihao², YANG Ying¹, ZHANG Xiuli¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Hunan Province 410007; 2. First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To compare the differences of dose-effect relationship in the toxicity qualitative response between the ultrafine powder and coarse powder of strychni semen on mice. **Methods** The acute toxicity test and 7-day repeated dose toxicity test were used. The dose-effect and time-effect of ultrafine powder on the qualitative response of strychni semen were observed according to the mortality rate, median lethal dose (LD_{50}), minimum lethal dose ($MLDL_{D_1}$) and maximum tolerated dose ($MTDL_{D_0}$). **Results** The LD_{50} , $MLDL_{D_1}$ and $MTDL_{D_0}$ of strychni semen ultrafine powder on male mice was 194.7 mg/kg, 100 mg/kg and 85 mg/kg respectively and on female mice was 163.0 mg/kg, 85 mg/kg and 70 mg/kg respectively. The LD_{50} , $MLDL_{D_1}$ and $MTDL_{D_0}$ of strychni semen coarse powder on male mice was 295.7 mg/kg, 115 mg/kg and 100 mg/kg respectively and on female mice was 271.8 mg/kg, 100 mg/kg and 85 mg/kg respectively. As the dose increased, the death latency of mice induced by strychni semen ultrafine powder was shortened more quickly than coarse powder. **Conclusion** The toxicity response of strychni semen ultrafine powder and coarse powder is similar in mice. The acute toxicity has a time-effect relationship with dose-dependence. The micronization can increase the acute toxicity and repeated dose toxicity in the lethal qualitative response.

Keywords strychni semen ultrafine powder; median lethal dose; minimum lethal dose; maximum tolerated dose

量效关系是指药理效应在一定范围内随着剂量的变化而变化的规律性变化, 效应的改变有不同的表现、强度和性质之分, 可以是量反应的变化也可以是质反应的变化。量反应可以用测量值来表示, 是程度的差异; 而质反应无程度的差异, 只能用“有”或“无”来表示。马钱子粉用于治疗类风湿性关节炎等免疫系统疾病, 疗效确切, 力猛效捷^[1-2], 受到历代医家的青睐。但是由于其有效成分即为毒性成分, 治疗量与中毒量接近, 故临床应用受到严重限制。2010 年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)(一部)收录了马钱子粉(细粉), 由于粉碎设备的日益先进, 马钱子粉碎后其细粉中含有一定的超

微粉。前期研究表明, 微粉化促进了中药药效成分溶出的同时, 其毒性成分的溶出也相应提高, 生物利用度提高, 生物效应增强^[3-4]。本研究采用马钱子粗粉(即超微粉碎的入磨粒径)为对照, 以马钱子超微粉的半数致死剂量(LD_{50})、最小致死剂量($MLDL_{D_1}$)、最大耐受剂量($MTDL_{D_0}$)为指标, 考察微粉化对马钱子质反应毒性量效关系的影响, 从而为临床安全用药提供试验数据。

1 材料

1.1 药物

马钱子购自湖南中医药大学第一临床医学院, 经鉴定为马钱科植物云南马钱 *Strychnos pierriana*

A. W. Hill 的干燥成熟种子,其质量符合 2010 年版《中国药典》(一部)马钱子项下规定^[5]。马钱子超微粉(D_{90} 为 37.74 μm)与其粗粉(200~800 μm)均采用同一批原料制备而成,批号分别为 W200090203、C200090203,临用前以蒸馏水配成混悬液。

1.2 动物

SPF 级 ICR 小鼠 282 只,雌鼠 144 只,雄鼠 138 只,2 月龄,体重 18~22 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号:SCXK(湘)2009-0004;实验动物环境设施合格证号:SYXK(湘)2009-0001。

2 方法

2.1 急性毒性试验

2.1.1 剂量确定 由于马钱子超微粉与其粗粉毒性相对较大,本实验采用序贯法^[6]进行急性毒性预试验。取 ICR 小鼠 102 只,雌鼠 54 只,雄鼠 48 只,禁食 14 h,不禁水,以随机数字表法超微粉组雄鼠分为 8 组,超微粉组雌鼠分为 9 组。雄性小鼠给予马钱子超微粉 100.0、123.5、152.4、162.0、200.0、246.9、274.4、300.0 mg/kg,雌性小鼠给予马钱子超微粉 90.0、100.0、123.5、152.4、162.0、200.0、246.9、274.4、300.0 mg/kg;粗粉组雌雄各半,以随机数字表法各分为 8 组,雄性小鼠给予马钱子粗粉 180.0、200.0、243.0、300.0、370.4、411.5、450.0、508.1 mg/kg,雌性小鼠给予马钱子粗粉 180.0、200.0、243.0、300.0、370.4、411.5、450.0、508.1 mg/kg,每组给药 1 次,灌胃体积为 20 ml/kg,观察给药后小鼠毒性反应和死亡情况,分别测定马钱子超微粉与其粗粉 0%致死量(D_n)和 100%致死量(D_m)。

经测定马钱子超微粉雄性小鼠 D_n 和 D_m 为 162.0 mg/kg 和 274.3 mg/kg,雌性小鼠为 100.0 mg/kg 和 246.9 mg/kg;马钱子粗粉雄性小鼠 D_n 和 D_m 为 180.0 mg/kg 和 450.0 mg/kg,雌性小鼠为 180.0 mg/kg 和 450.0 mg/kg。

2.1.2 分组及给药 ICR 小鼠 80 只,雌雄各半,以随机数字表法分为 2 组,分别是马钱子超微粉组、马钱子粗粉组,每组 40 只。马钱子超微粉按 0.88 等比给药,雄性小鼠为 162.0、184.7、210.7、240.4、274.3 mg/kg,雌性小鼠为 100.0、125.2、157.0、196.9、246.9 mg/kg;马钱子粗粉按 0.80 等比给药,雄性小鼠为 180.0、226.4、284.6、357.9、450.0 mg/kg,雌性小鼠为 180.0、226.4、284.6、357.9、

450.0 mg/kg。上下法灌胃^[7],每日 1 次,剂量为 20 ml/kg。

2.1.3 LD_{50} 测定^[7] 给药后即刻观察动物的活动、毛色、大小便和眼、鼻、口腔分泌物以及毒性反应情况。24 h 内未死亡小鼠连续观察 14 天,并记录动物死亡情况,按上下法的公式计算 LD_{50} 和 LD_{50} 95%可信区间。 $LD_{50} = \log^{-1}[X_0 + i(A/N - 0.5)]$; LD_{50} 的标准误 $Sx_{50} = i/N^{1/2}[1.46(NB - A^2)/N^2 + 0.167]$ (X_0 为中间剂量的对数, i 为相邻两个剂量的对数的差值, A 为反应数与组序的乘积, B 为反应数与组序的平方的乘积, N 为各剂量死亡动物数的总和, 1.46、0.5 与 0.167 为公式中固定数字)。

2.2 MLDD₁、MTDD₀ 试验

2.2.1 分组与给药 ICR 小鼠 100 只,雌雄各半,以随机数字表法分为 10 组,分别是马钱子超微粉 70、85、100、115、130 mg/kg 组、粗粉 85、100、115、130、145 mg/kg 组,每组 10 只。灌胃给药,每日 1 次,给药体积为 20 ml/kg,连续给药 7 天,若组内出现中毒性死亡,则停止给药。

2.2.2 观测指标 观察动物的活动、毛色、大小便和眼、鼻、口腔分泌物以及毒性反应情况、死亡与否及死亡个数,每组实验动物中不引起小鼠死亡的最大剂量计为 MTDD₀,每组实验动物中仅引起个别小鼠死亡的剂量计为 MLDD₁。

3 结果

3.1 急性毒性试验

3.1.1 马钱子超微粉与其粗粉对 ICR 小鼠的 LD_{50} 影响比较 ICR 小鼠灌胃给予马钱子超微粉及粗粉后活动增加,呼吸加快,部分小鼠出现痉挛、抽搐或死亡,20 min 后存活小鼠行为活动逐渐恢复,14 天内 ICR 小鼠无新增死亡;未观察到小鼠眼、鼻、口腔分泌物,未见其大小便明显异常。表 1 示,马钱子超微粉雄鼠 LD_{50} 小于其雌鼠,粗粉雄鼠 LD_{50} 大于其雌鼠。与马钱子粗粉组比较,其超微粉组 LD_{50} 明显减小。提示马钱子超微粉与其粗粉的毒性可能存在性别差异;微粉化后马钱子的毒性增大。

表 1 马钱子超微粉与其粗粉对 ICR 小鼠的 LD_{50} 影响比较(mg/kg)

组别	雄鼠		雌鼠	
	LD_{50}	95%可信区间	LD_{50}	95%可信区间
马钱子超微粉	194.7	180.7~208.7	163.0	127.8~198.2
马钱子粗粉	295.7	259.7~331.7	271.8	219.9~323.7

3.1.2 致死时效关系分析 表 2、表 3 示,随着马

钱子超微粉与其粗粉剂量的增加,小鼠死亡潜伏期随之缩短。从时反应量效关系线性回归拟合线的斜率分析,随着剂量的增加,马钱子超微粉致小鼠死亡更快,雄鼠对马钱子超微粉与其粗粉的耐受性更差。马钱子超微粉及粗粉的毒性存在剂量依赖性的时反应量-效关系。

表 2 马钱子超微粉与其粗粉致雄性及雌性小鼠死亡的潜伏时间

组别	雄鼠		雌鼠	
	剂量 (mg/kg)	死亡潜伏时间 (min)	剂量 (mg/kg)	死亡潜伏时间 (min)
马钱子超微粉	184.7	15.67±4.04	125.2	12.00±0.01
	210.7	8.00±4.12	157.0	7.67±0.58
	240.4	7.00±2.83	196.9	6.00±1.29
马钱子粗粉	284.6	11.50±6.35	246.9	5.00±1.41
	357.9	9.00±5.89	226.4	15.00±2.83
	450.0	3.00±0.01	284.6	12.50±5.20
			357.9	8.00±4.58
			450.0	5.00±0.01

表 3 马钱子超微粉与其粗粉致死量效关系的线性回归方程

组别	雄鼠	雌鼠
马钱子超微粉	$y = -0.153x + 42.602$ ($r = 0.8977$)	$y = -0.054x + 17.398$ ($r = 0.9113$)
马钱子粗粉	$y = -0.052x + 26.759$ ($r = 0.9920$)	$y = -0.046x + 25.298$ ($r = 0.9860$)

注:方程中 y 值为致死潜伏期, x 为剂量,斜率为随着剂量增加小鼠致死潜伏期缩短的速度

3.2 马钱子超微粉与其粗粉的 MLDLD₁、MTDLD₀ 测定

表 4 马钱超微粉与其粗粉 ICR 小鼠的 MLDLD₁、MTDLD₀ (mg/kg)

类别	雄鼠		雌鼠	
	MLDLD ₁	MTDLD ₀	MLDLD ₁	MTDLD ₀
马钱子超微粉	100	85	85	80
马钱子粗粉	115	100	100	85

表 4 示,马钱子超微粉雄鼠 MLDLD₁ 为 100 mg/kg,相当于 70kg 人日用剂量 769.2 mg; MTDLD₀ 为 85 mg/kg,相当于 70kg 人日用剂量 653.8 mg。马钱子超微粉雌鼠 MLDLD₁ 是 85 mg/kg,相当于 70kg 人日用剂量 653.8 mg; MTDLD₀ 为 70 mg/kg,相当于 70kg 人日用剂量 538.5 mg。马钱子粗粉对雄鼠的 MLDLD₁ 为 115 mg/kg,相当于 70kg 人日用剂量 884.6 mg; MTDLD₀ 为 100 mg/kg,相当于 70kg 人日用剂量 769.2 mg。马钱子粗粉对雌鼠的 MLDLD₁ 是 100 mg/kg,相当于

70kg 人日用剂量 769.2 mg; MTDLD₀ 是 85 mg/kg,相当于 70kg 人日用剂量 653.8 mg。提示马钱子超微粉的毒性大于其粗粉,马钱子超微粉与粗粉对雄鼠的毒性均小于雌鼠。

4 讨论

上下法最大的特点是节省动物,同时,不但可以进行毒性表现研究,还可以估算 LD₅₀ 及其可信区间,适用于能引起动物快速死亡的药物^[8]。根据马钱子超微粉与其粗粉的毒性表现,完全符合上下法的要求,故采用此法进行实验。

2010 版《中国药典》(一部)马钱子粉项下规定临床成人日用量为 0.3~0.6g。按体重计算,马钱子超微粉雄鼠 LD₅₀ 197 mg/kg,相当于体重 70kg 成人临床用量的 22.64 倍,雌鼠 LD₅₀ 163 mg/kg 相当于 19.02 倍;其粗鼠 LD₅₀ 295 mg/kg,相当于 34.4 倍,雌鼠 LD₅₀ 271.8 mg/kg 相当于 31.71 倍。按体表面积折算,马钱子超微粉雄鼠 LD₅₀ 相当于 2.50 倍,雌鼠 2.09 倍;粗粉雌鼠 LD₅₀ 相当于 3.79 倍,雌鼠 3.48 倍。以 LD₅₀ 为指标,马钱子超微粉急性毒性相当于其粗粉的 1.52 倍,微粉化后重复给药毒性增强了 16%~20%。提示微粉化后马钱子粉的急性毒性增强。

马钱子超微粉与其粗粉的急性毒性存在剂量依赖性的时反应量-效关系。随着剂量的增加,死亡潜伏期缩短,且马钱子超微粉较粗粉致小鼠死亡潜伏期缩短更快;同时马钱子超微粉与其粗粉致雄性小鼠死亡的潜伏期也较雌性缩短更快。

马钱子粉临床应用方式一般为多次给药^[9],本试验以 MLDLD₁、MTDLD₀ 为指标,以粗粉(入磨粒度)为对照,考察微粉化对马钱子重复给药毒性的影响。结果表明,以 MLDLD₁ 为指标,雄鼠马钱子超微粉为 100 mg、其粗粉为 115 mg;雌鼠马钱子超微粉为 85 mg、其粗粉为 100 mg。以 MTDLD₀ 为指标,雄鼠马钱子超微粉为 85 mg,其粗粉为 100 mg;雌鼠马钱子超微粉为 80 mg,其粗粉 85 mg。结果表明,以 MLDLD₁ 为指标,微粉化后重复给药致死质反应毒性增强了 16%~20%;以 MTDLD₀ 为指标,该毒性增强了 15%~17%。提示微粉化后制马钱子的重复给药质反应毒性增强。

马钱子超微粉与其粗粉对雌鼠的毒性略高于雄鼠,但雄鼠对马钱子毒性的耐受性却低于雌鼠,提示性别可能是实验毒性耐受力的差异性因素。马钱子

(下转第 982 页)

- [9]陈荣.《温病条辨》宣肺十二法[J].福建中医药,1986,17(1):42.
- [10]汝触会.风温肺热病痰热结胸证便秘与少尿的临床观察[J].浙江中西医结合杂志,2007,17(5):290.
- [11]秦亮.王玉玲治疗麻疹“五顺五逆”的经验[J].黑龙江中医药,1990,(4):4.
- [12]樊祖仁.宣白承气汤加味治疗小儿麻疹肺炎经验[J].陕西中医,1983,4(6):3.
- [13]王培林.麻疹合并肺炎治疗体会[J].陕西中医,1996,17(12):566.
- [14]辜宝祥,胡建和.疫毒痢治验二则[J].江西中医药,1987,18(1):40.
- [15]方泓,刘芳,吴银根.运用温病理论治疗 SARS 临床心得[J].上海中医药大学学报,2003,17(4):16.
- [16]金妙文,周仲瑛,符为民.流行性出血热中医治疗常规[J].南京中医学院学报,1988,(4):10-13.
- [17]文益华.清解汤治疗小儿外感高热 100 例[J].陕西中医,1991,12(12):541.
- [18]刘亚军,王春生.清热通腑汤治疗外感发热[J].首都医药,1996,6(6):39.
- [19]李连生.宣肺通腑汤治疗小儿支气管炎 35 例临床观察[J].天津中医药,1988,(3):27.
- [20]刘灿康.凉膈散治疗小儿肺炎[J].内蒙古中医药,1989,8(1):24.
- [21]李志沧,吴海淮.宣肺通腑法治疗小儿肺炎[J].四川中医,1985,3(8):23.
- [22]张孝,沙丽彬.宣肺通腑法治疗小儿肺炎例析[J].中医函授通讯,2000,19(2):35.
- [23]黄华.宣肺通腑法治疗小儿支原体肺炎 6 例[J].中西医结合临床杂志,1992,2(2):44.
- [24]林玲.通腑宣肺治疗小儿支原体肺炎验案举隅[J].北京中医药大学学报,1994,17(6):18.
- [25]刘弼臣,郝珍.从肺卫论治小儿病毒性心肌炎的经验[J].中国医药学报,1990,5(2):45.
- [26]周吕.胃肠生理学[M].北京:科学技术出版社,1991:726-727.
- [27]匡调元.中医病理研究[M].上海:上海科学技术出版社,1980:145.
- [28]谷振勇.过氧亚硝基阴离子介导内毒素致肺血管损伤及胆囊收缩素的保护作用[J].生理科学进展,2001,32(2):135-137.
- [29]严仪昭,陈祥银,西品香.内毒素引起的急性肺损伤的实验研究[J].中华结核及呼吸系统疾病杂志,1984,8(1):7.
- [30]韩国栋.“肺与大肠相表里”理论中西医结合研究进展[J].天津中医,1995,12(4):45.
- [31]靳文学,杨宇.从粘膜免疫系统看“肺与大肠相表里”[J].四川中医,2005,23(12):1.
- [32]张小虎,古继红,区永欣,等.肺主肃降与“肺与大肠相表里”相关性的实验研究及其应用探讨[J].中华中医药学刊,2008,26(9):2059-2062.
- [33]曾兆麟,李玉梅.从中医肺与大肠相表里理论探索难治性非典型性肺炎(SARS)治疗的新思路[J].上海中医药杂志,2003,37(5):32.
- [34]区永欣,张小虎,古继红,等.肺气宣降的病理生理研究及其对防治急性呼吸道感染的临床意义[J].广州中医药大学学报,2007,24(5):423-424.
- [35]王树权.图注八十一难经译[M].北京:科学技术文献出版社,1992:177.
- (收稿日期:2012-04-07;修回日期:2012-10-30)
- [编辑:李 巍]

(上接第 960 页)

超微粉及粗粉小鼠灌胃的毒性反应相似,但微粉化后其质反应与量反应毒性明显增强。临床应用马钱子超微粉应减少用量,且应密切关注男性长期用药的毒性反应,确保用药的安全与有效。

参考文献

- [1]杨惠,王宇红,张秀丽,等.马钱子超微粉对类风湿性关节炎模型大鼠量效关系参数研究[J].中国中医急症,2012,21(12):1948-1950.
- [2]王宇红,莫韦浩,邓东方,等.不同粒径马钱子粉对类风湿性关节炎模型大鼠的影响及安全性比较研究[J].中草药,2012,43(4):743-749.
- [3]杜贵友,方文贤.有毒中药现代研究与合理应用[M].北京:人民卫生出版社,2003:305-306.
- [4]Teske J, Weller JP, Albrecht UV, et al. Fatal intoxication due to brucine [J]. Anal Toxicol, 2011, 35(4):248-253.

- [5]国家药典委员会.中华人民共和国药典·一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:47-48.
- [6]魏伟,吴希美,李元建.药理实验方法学[M].4版.北京:人民卫生出版社,2010:391-392.
- [7]陈奇.中药药理研究方法学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006:107-109.
- [8]蔡光先.单味中药超微饮片的质量标准研究[M].湖南:湖南科学技术出版社,2007:203.
- [9]房丹,刘维,刘晓亚,等.马钱子药理学研究进展[J].辽宁中医杂志,2007,34(7):1018-1019.
- (收稿日期:2012-09-12;修回日期:2013-01-20)
- [编辑:洪 涛]