

不同提取路线合欢皮皂苷对荷瘤小鼠的毒性研究

杜芳芳, 陈丽敏, 刘玲艳, 高越颖, 冯磊, 邱丽颖*, 金坚(江南大学医药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 目的 研究不同提取路线提取的合欢皮皂苷对荷瘤小鼠的毒性影响。方法 取 H22 肝癌细胞腹腔内接种 7 d 的小鼠腹水, 无菌条件下于小鼠的右腋下接种制备小鼠实体瘤模型。实验分为对照组、模型组、3 条不同路线提取的皂苷组(分别记为组分 1、组分 2、组分 3, $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。连续观察 10 d, 记录小鼠体重、饮食变化、小鼠存活率, 并计算其器官指数。结果 与模型组相比, 皂苷组的小鼠均出现了不同程度的毒性表现, 体重和饮食量呈现一定的下降趋势; 组分 1、组分 2、组分 3 的存活率分别为 75%, 50%, 62.5%; 组分 1 对各器官指数无明显差异, 组分 2 明显增加小鼠的肝、脑器官指数, 组分 3 的皂苷明显增加小鼠的脑器官指数。结论 3 条不同路线提取的皂苷对荷瘤小鼠毒性不同, 以组分 2 毒性最大。

关键词: 合欢皮皂苷; 提取工艺; 毒性; 肿瘤

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)13-1308-04

合欢皮(*Albizia Cortex*)为合欢树皮(*Albizia julibrissin* Durazz), 具有解郁安神、活血消肿的功能, 用于心神不安、忧郁失眠、肺痈疮肿等症。合欢皮中含有三萜、黄酮、木脂素、生物碱、鞣质及多糖等多种化学成分^[1]。研究表明, 合欢皮具有镇静、抗生育、抗菌、抗癌等作用^[2], 但大多是对其体外细胞毒作用的研究。笔者前期工作发现, 合欢皮提取物具有显著抗肿瘤新生血管的作用^[3-7], 但对正常鼠也存在一定的毒副作用^[8-9], 但对肿瘤鼠的毒性表现的报道较少。为此, 本试验对不同工艺路线提取合欢皮的总皂苷对 H22 荷瘤小鼠的毒性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 提取材料

合欢皮(无锡山禾药业集团, 批号: 090401), 由南京中医药大学陈健伟教授鉴定为合欢 *Albizia julibrissin* Durazz 的干燥树皮, 产地: 浙江; 乙醇、氯仿、正丁醇均为市售分析纯。

1.2 分离提取路线

70%乙醇加热提取 2 次, 提取液浓缩至无乙醇。通过 D101 型大孔树脂柱吸附后依次用水、35%和 80%乙醇进行梯度洗脱, 收集 80%洗脱组分, 冷冻干燥^[10]。

将所得的冻干粉 500 mg 溶于 50 mL 的水中,

作者简介: 杜芳芳, 女 Tel: 15995251676 E-mail: jndxdff@126.com
E-mail: qly325@126.com

*通信作者: 邱丽颖, 女, 博士, 教授 Tel: 13861690781

分别按照 3 条不同的分离提取路线提取冻干粉中的皂苷, 收集各个组分以及最后的水相, 冷冻干燥后即为本实验所用的初始样品。

提取过程中各物质均与提取液按 1:1 的体积量进行提取。

路线 1: 先将用上述冻干粉制备的溶液的 pH 调制成碱性, 并用氯仿多次萃取生物碱。然后调成酸性, 用氯仿多次萃取黄酮。再将溶液调成中性, 用正丁醇多次提取皂苷, 记为组分 1。

路线 2: 先将用上述冻干粉制备的溶液 pH 调成酸性, 并用氯仿多次萃取黄酮。然后调成碱性, 氯仿多次萃取生物碱。最后调成中性, 正丁醇多次提取皂苷, 记为组分 2。

路线 3: 先将用上述冻干粉制备的溶液 pH 调成中性, 正丁醇多次提取皂苷, 记为组分 3。然后调成碱性, 氯仿多次萃取生物碱。最后调成酸性, 氯仿多次萃取黄酮。

1.3 活性组分定性分析

对各路线提取的皂苷成分进行定性分析, ①检查生物碱: 碘-碘化钾试剂、磷钼酸试剂; ②检查皂苷: 泡沫实验、乙酸酐-浓硫酸反应; ③检查黄酮类化合物: 盐酸-镁粉反应、碱液试验及盐酸-锌粉反应。

1.4 皂苷的定量分析方法

不同工艺路线提取的总皂苷的含量以齐墩果酸的相当量为计算标准。已有文献[11]报道合欢皮中各种皂苷单体主要是以齐墩果酸作为母核, 分子量在 1 800~2 400 之间, 平均分子量约为 2 000, 而齐墩果酸分子量仅为 456, 因此本实验以齐墩果酸作为标准品进行定量时需乘以其量比系数 4.386, 故其计算公式为: 合欢皮皂苷含量(mg)=样品中齐墩果酸相当量(mg)×4.386

精确称取 4 mg 齐墩果酸标准品粉末, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并定容。分别精确吸取齐墩果酸标准品甲醇溶液(0.4 mg·mL⁻¹)0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL 置于 10 mL 具塞比色管中, 70 °C 水浴蒸干甲醇溶液, 再加入 0.3 mL 0.5% 香草醛-冰醋酸溶液及 0.8 mL 的高氯酸, 摇匀于 60 °C 水浴中加热 15 min, 取出后流水冷却, 加入冰醋酸至 5 mL, 用紫外分光光度计于 560 nm 处测定其吸光度。以齐墩果酸标准品质量(mg)为横坐标, 吸光度为纵坐

标, 绘制标准曲线, 计算回归方程。合欢皮皂苷也用上述方法测其吸光度, 由回归方程计算其齐墩果酸的相当量(mg), 再折算成合欢皮皂苷的质量。合欢皮含量计算公式为: 合欢皮的含量(%)=合欢皮的质量(mg)/冻干粉的质量(mg)。

1.5 试验动物及给药方法

1.5.1 试验动物 小鼠 H22 肝癌瘤株购自上海医药工业研究院药理研究室。健康 ICR 小鼠 40 只, ♀, 鼠龄 4~5 周, 体重(20±2)g, 购自上海斯莱克试验动物有限责任公司, 实验动物合格证号: SCXK(沪)2007-0005。

1.5.2 给药方法 将所得的皂苷类冻干粉各组分用生理盐水配成 5 mg·kg⁻¹, 灌胃给药, 每天 1 次, 连续 10 d。各组均在造模后 24 h 准确灌胃给药。模型组以生理盐水灌胃。各组动物饲养温度 25 °C, 相对湿度 55%, 自由饮食饮水。

1.6 H22 肿瘤小鼠模型的建立及分组

取 H22 肝癌细胞腹腔内接种 7 d 的小鼠, 无菌条件下抽取腹水, 0.4% 台盼蓝染色, 低倍显微镜下观察计数活细胞率>90%。用 0.9% 生理盐水稀释调整浓度至 1×10⁷ 个·mL⁻¹, 将细胞悬液置于冰上, 用 1 mL 无菌注射器分别于每只小鼠右腋下接种细胞悬液 0.2 mL, 所有操作在半小时内完成。动物造模右腋下接种作为实体瘤小鼠。将动物随机分成空白对照组、模型组、组分 1 给药组, 组分 2 给药组、组分 3 给药组 5 组, 每组小鼠均为 8 只。

1.7 观察指标

1.7.1 一般观察 鼠体重的变化趋势, 在小鼠造模后持续给药, 每天称量其体重, 观察其体重的变化情况、小鼠的精神状态、外观体征等。小鼠饮食量的变化: 造模后每天称量其饮食量, 观察其饮食量的变化情况, 以每克体重日平均饮食[日饮食量(g)/小鼠平均体重(g)]作为计算基准。

1.7.2 存活率 观察小鼠的存活时间。计算造模后 10 d 内各组小鼠的存活率(存活小鼠数/总小鼠数)。

1.7.3 器官指数 给药 10 d 后处死存活小鼠, 小心分离其各器官, 称量其质量, 计算各组的器官指数, 器官指数=器官重量(mg)/体重(g)。

1.8 统计学处理

应用 SPSS 11.0 统计软件对实验结果进行统计学分析, *t* 检验, 以 *P*<0.05 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 不同路线提取的皂苷的定性实验结果

各路线所提取的组分中均含有皂苷成分, 试验验证结果见表 1。不同路线提取的皂苷含量, 组分 1 为 44.5%, 组分 2 为 34%, 组分 3 为 63%。

表 1 3 条路线中皂苷的定性实验结果

Tab 1 Julibroside from three routes of qualitative results

检查项	实验方法	组分 1	组分 2	组分 3
生物碱	碘-碘化钾试剂	-	-	-
	磷钼酸试剂	-	+	+
皂苷	泡沫实验	+	+	+
	乙酸酐-浓硫酸实验	+	+	+
黄酮类化合物	盐酸-镁粉反应	-	-	-
	碱液实验	-	-	-
	盐酸-锌粉反应	-	-	-

2.2 小鼠体重变化情况

连续给药 10 d 后, 各组小鼠的体重增长见图 1。

由图 1 看出, 对照组的体重具有一定的增长趋势, 组分 1、组分 2 给药的对小鼠的体重均有一定的负增长趋势, 组分 3 在给药的前期对小鼠的体重有负增长趋势, 在后期有正增长趋势。各组给药组小鼠的体重与对照组在给药 10 d 后相比均有明显的差距, 说明各组分的皂苷对小鼠的生长造成一定的毒性。小鼠在给药期间对照组的小鼠精神状态较好, 比较温顺且体毛比较干燥顺滑、精神状态较好, 活动自如。给药各组小鼠的精神状态较浮躁并发出吱吱声, 体毛成束, 体重也有所下降, 活动频率较低。与对照组相比, 给药各组小鼠体重均明显小于对照组的小鼠。且由图 1 可知, 给药各组的小鼠体重变化幅度较大, 体重呈下降趋势较多。而对照组小鼠的体重变化比较和缓, 体重呈上升趋势。

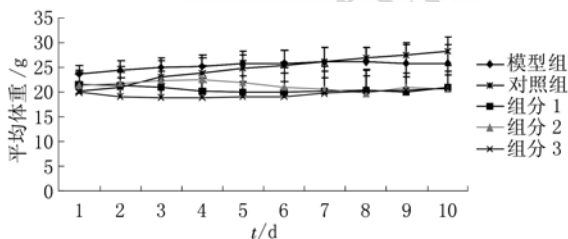


图 1 小鼠体重随时间变化曲线图

Fig 1 The mice body weight-time curve

2.3 小鼠饮食量的变化

连续给药 10 d, 各组小鼠饮食量的变化见图 2。由图 2 可看出, 各组给药的小鼠和模型对照组的小鼠, 在给药期间其饮食量均呈一定的下降趋势, 但对照组的下降趋势较给药各组小鼠的小, 其具有一定的治疗作用, 但也对小鼠的食欲造成一定的影响。组分 2 给药的小鼠出现明显的下降趋势, 毒性最大。

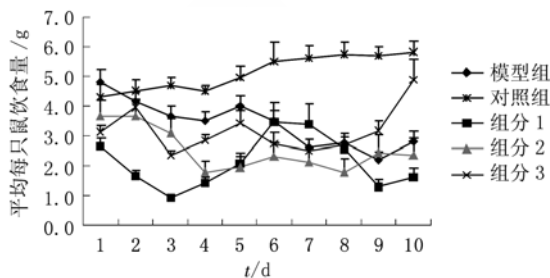


图 2 小鼠饮食量随时间变化曲线图

Fig 2 The diet of mice change with time curve

2.4 小鼠平均存活率

连续给药 10 d 后, 对照组及模型组的小鼠全部存活下来, 而其他 3 组给药组的小鼠从给药第 2 天起均出现相继的死亡, 10 d 后组分 1 组存活率为 75%, 组分 2 组为 50%, 组分 3 组为 62.5%。对照组的小鼠较给药组的小鼠存活时间长, 存活率高, 说明了其余 3 组的药用成分对小鼠产生了不同程度的毒性作用, 其中组分 2 给药组的小鼠的存活率最低, 毒性作用最大。

2.5 对小鼠各器官指数的影响

各组小鼠的器官指数见表 2。由表 2 可看出, 与模型对照组相比较, 组分 2、3 喂养小鼠的肝、脾、胃的器官指数均呈一定的上升趋势, 3 个组分对小鼠的脑器官指数均呈上升趋势, 对器官存在一定的毒性, 其毒性成分可能较易分布在这些器官, 在脑组织中易富集, 毒性成分较易通过血脑屏障。组分 2 明显增加小鼠脾、脑的器官指数, 说明对小鼠的免疫系统和神经系统均产生一定的毒性作用。组分 2 给药组的小鼠器官指数均明显大于其余各组, 对小鼠的毒性作用最明显。组分 3 明显增加小鼠脑器官指数, 表明对小鼠的神经系统产生一定毒性。但对各组小鼠的血液凝固时间并无明显差异。

表 2 各组小鼠器官指数($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Tab 2 The organ index of different mice groups($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	心	肝	脾	肺	肾	胃	胸腺	脑
空白对照组	5.39±1.36	51.73±6.73	5.78±0.49	11.55±6.02	14.51±3.09	9.12±1.34	2.44±1.94	14.51±1.47
模型组	5.33±1.01	51.85±9.01	6.34±4.21	8.84±3.74	14.88±2.58	7.76±1.76	2.35±0.81	11.50±2.06
组分 1	4.59±1.03	50.94±4.36	4.98±2.03	8.36±5.33	15.01±3.88	8.14±1.10	2.02±0.92	11.91±2.17
组分 2	4.83±0.82	59.98±9.13	9.61±1.23 ¹⁾	10.01±5.78	13.44±1.44	8.36±1.40	2.05±0.99	13.76±2.46 ¹⁾
组分 3	5.24±0.76	52.73±0.89	6.48±0.88	9.25±4.18	15.68±1.97	9.45±2.89	3.09±1.46	15.84±1.40 ²⁾

注：与模型组相比，¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

3 讨论

本试验表明，小鼠灌胃给药后其体重不断减少，进食量不断下降，并相继出现小鼠的死亡。给药组小鼠的存活率均较对照组的存活率低，给药组小鼠的部分器官指数与对照组小鼠相比具有显著的差异，在解剖时也发现给药组的小鼠心尖出现积血，肝、肺器官出现片状出血以及给药各组小鼠的精神状态较浮躁并发出吱吱声，体毛成束，活动频率较低。各方面表现均反映了不同工艺路线提取的皂苷提取物对小鼠产生了不同程度的毒性作用。其中以组分 1 的毒性作用最小，存活率最高，器官指数均无明显差异。组分 2 的毒性作用最大，存活率最低，明显增加小鼠的肝、脑器官指数并对其体重和饮食产生了明显的下降趋势。从器官指数来看，组分 3 给药组的器官指数均比其他各组的要大，从定量结果来看组分 3 的皂苷纯度较其他各组要高，这也暗示了皂苷的毒性作用的大小与其含量的多少具有一定的正相关性。通过此研究不仅为开发传统中药，选择和改进提取工艺路线，研制新的治疗肿瘤的有效组分，开发出高效低毒安全的药物提供依据，同时为临床合理有效用药提供依据。但是，合欢皮的

毒理机制有待进一步研究。

参考文献

[1] 邹坤, 陈四平, 赵玉英, 等. 合欢皮属植物茎皮的化学成分与药理活性[J]. 国外医学: 植物药分册, 1997, 12(5): 200.

[2] 蔚冬红, 乔善义, 赵毅民. 中药合欢皮研究概况[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(7): 619-624.

[3] 金坚, 花慧, 张莲芬, 等. 抑制血管生成的合欢属植物提取物的组合物及其制备和应用: CN101167787 [P]. 2008-04-30.

[4] 金坚, 花慧, 张莲芬, 等. 合欢皮中具有抑制血管生成作用的活性成分及其制备方法和应用: CN 101239093 [P]. 2008-08-13.

[5] 陈丽敏, 王华, 康晓星, 等. 合欢皮总皂苷对小鼠肿瘤新生血管的抑制作用[C]. //中国药理学会. 中国药理学会第十次学术会议专刊. 北京: 2009.

[6] 冯磊, 花慧, 邱丽颖, 等. 王不留行提取物抑制血管生成的药效学研究[J]. 中草药, 2009, 40(12): 1949-1952.

[7] 冯磊, 花慧, 邱丽颖, 等. 王不留行抑制血管形成的研究[J]. 中药材, 2009, 32(8): 1256-1259.

[8] 刘冬, 高越颖, 赵建国, 等. 合欢皮总皂苷对大鼠循环系统的影响[J]. 海峡药学, 2010, 22(2): 28-30.

[9] 赵建国, 刘玲艳, 刘冬, 等. 合欢皮总皂苷急性毒理学研究[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(4): 582-586.

[10] 陈爽, 邱丽颖, 金坚, 等. 大孔吸附树脂分离纯化合欢皮总皂苷的工艺研究[J]. 中成药, 2009, 31(12): 1848-1851.

[11] 冯磊, 陈爽, 邱丽颖, 等. 紫外分光光度法测定合欢皮中总皂苷的含量[J]. 华西药学杂志, 2009, 24(6): 642-644.

收稿日期: 2010-04-01