

文章编号: 1004-4353(2020)01-0065-04

长白瑞香提取物的急性毒性及其体外 抗弓形虫的研究

赵鹏宇, 徐乐乐, 金春美, 张昌浩, 金莉莉*

(延边大学 药学院, 吉林 延吉 133002)

摘要: 为研究长白瑞香提取物的急性毒性及其体外抗弓形虫的作用,采用最大耐受量法测定小鼠口服长白瑞香乙醇提取物的急性毒性,采用四唑盐(MTT)比色法测定长白瑞香乙醇提取物及其 4 个萃取物体外抗弓形虫的作用.结果显示:在观察期 14 d 内,高(10 g/kg)、低(5 g/kg)剂量组均未见小鼠死亡,且小鼠体重和主要脏器无变化;长白瑞香乙醇提取物对小鼠的半数致死量(LD₅₀)大于 10 g/(kg·BW),属实际无毒.乙酸乙酯和二氯甲烷萃取物抗弓形虫的作用较为明显,二者对感染弓形虫前后的 HeLa 细胞的半抑制浓度(IC₅₀)分别为 298.7 μg/mL、208.2 μg/mL 和 298.6 μg/mL、206.1 μg/mL,选择性指数(SI)均为 1.4. 上述研究结果可为进一步开发利用长白瑞香提供参考.

关键词: 长白瑞香提取物; 急性毒性; 抗弓形虫

中图分类号: R961.1

文献标志码: A

Evaluation of acute toxicity of *Daphne koreane* Nakai extract and its anti-*Toxoplasma in vitro*

ZHAO Pengyu, XU Lele, JIN Chunmei, ZHANG Changhao, JIN Lili*

(College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: In order to study the acute toxicity of *Daphne koreane* Nakai extract and its anti-*Toxoplasma* efficacy *in vitro*, the acute toxicity of the ethanol extract of *Daphne koreane* Nakai in mice was determined by the maximum tolerance method, and the anti-*Toxoplasma* effect of the ethanol extract of *Daphne koreane* Nakai and its four extracts *in vitro* was determined by Tetrazolium salt (MTT) method. During the 14 d observation period, no mice died, no changes in body weight and main organs were observed in the high (10 g/kg) and low (5 g/kg) dose groups. The median lethal dose (LD₅₀) of the ethanol extract of *Daphne koreane* Nakai is higher than 10 g/(kg·BW), which is actually non-toxic. Ethyl acetate and dichloromethane extract, exhibit more obvious anti-*Toxoplasma* effect, with the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 298.7 μg/mL, 208.2 μg/mL and 298.6 μg/mL, 206.1 μg/mL for HeLa cells before and after the infected with *Toxoplasma gondii*, and selectivity indexes (SI) of 1.4. The above results imply references for further development and utilization of *Daphne koreana* Nakai in the later stage.

Keywords: *Daphne koreana* Nakai extract; acute toxicity; anti-*Toxoplasma*

长白瑞香(*Daphne koreana* Nakai)为瑞香科瑞香属落叶小灌木,又名辣根草、祖师麻,是长白山区的特有植物^[1].长白瑞香性味辛、热,有温中散阳、行癖止痛等功效^[2],亦有镇痛、抗风湿性关

节炎、抑制蛋白激酶活性、抗疟、保肝等药理活性^[3-5].目前学者已对长白瑞香的化学成分进行了较多研究,发现其主要含有瑞香素、瑞香苷、西瑞香素、伞形花内酯等^[4-8].

收稿日期: 2020-02-03

基金项目: 吉林省教育厅项目(612019069)

* 通信作者: 金莉莉(1978—),女,副教授,研究方向为中药现代化.

刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)简称弓形虫或弓形体,广泛寄生于人和多种动物的有核细胞内,是一种重要的机会致病原虫(opportunistic protozoa),可引起弓形虫病(toxoplasmosis)。目前治疗弓形虫病主要依靠抗生素、磺胺嘧啶、乙胺嘧啶等化学药物,但研究显示这些药物治疗弓形虫病的效果并不理想,且毒副作用大^[9]。近年来一些植物相继被报道具有良好的抗弓形虫活性^[10-11],但对于长白瑞香抗弓形虫作用的研究尚未见报道。基于此,本文对长白瑞香提取物的急性毒性及其体外抗弓形虫作用进行研究,以此为长白瑞香的开发和应用提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 实验材料

长白瑞香样品采于吉林省安图县二道白河镇(采集日期为 2018 年 8 月),经延边大学生药教研室吕惠子教授鉴定;昆明小鼠(体重为 18~23 g),延边大学实验室动物中心提供;弓形虫 RH 株、HeLa 细胞,延边大学药学院细胞培养室提供;胰蛋白酶-乙二胺四乙酸二钠盐溶液,北京 Solarbio 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),美国 GIBCO 公司;杜尔贝科改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM),Thermo 公司;乙胺嘧啶片,广州白云山光华制药股份有限公司;无水乙醇、石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇均为分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司;无菌生理盐水,龙井草仙药业有限公司;MTT 溶液,美国 Amresco 公司。

1.2 实验仪器

分析天平,上海精天电子仪器有限公司;低速离心机,德国 SIGMA 公司;DK-S28 电热恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;SH-1000 Lab 型酶标仪,日本 Corona Electric 公司;WZ-180SP 旋转蒸发仪,上海申生科技有限公司;HH-W 型恒温水浴箱,浙江金坛市恒丰仪器厂;SW-CJ 净化工作台,上海新苗医疗器械制造有限公司。

2 实验方法

2.1 长白瑞香提取物的制备

将 2.0 kg 长白瑞香干燥药材粉碎,加入质量分数为 85% 的乙醇超声提取 3 次,减压蒸发得到

550.0 g 乙醇提取物。在提取物中加入适量蒸馏水并将乙醇提取物均匀混悬,然后依次用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇溶剂等体积萃取 3 次。将各层萃取液合并,减压浓缩后得到石油醚萃取物 27.3 g,二氯甲烷萃取物 11.0 g,乙酸乙酯萃取物 50.2 g,正丁醇萃取物 82.3 g。

2.2 长白瑞香乙醇提取物的急性毒性实验

按照《食品安全国家标准食品安全性毒理学评价程序》(GB 15193.1—2014)进行实验。取昆明小鼠 18 只,随机分成 3 组(对照组、低剂量组、高剂量组,每组 6 只)并称重。采用最大耐受量法^[12]测定小鼠口服长白瑞香乙醇提取物的急性毒性。根据预实验结果,将低剂量组的给药量设置为 5 g/kg,高剂量组的给药量设置为 10 g/kg。小鼠禁食不禁水 12 h 后,对小鼠采用灌胃给药法等体积给药,各组给药体积均为 0.4 mL/10 g。观察、记录小鼠在给药期间的反应症状(观察期为 14 d),并在第 15 d 解剖所有小鼠,观察其心、肝、脾、肺、肾等脏器有无病理变化^[13-14]。

2.3 长白瑞香提取物的体外抗弓形虫实验

2.3.1 弓形虫悬液的制备 将保存于液氮罐中的弓形虫冻存管置于 37 °C 预热的恒温水浴锅内迅速溶解,然后将融化后的弓形虫悬液接种于小鼠腹腔;连续传代至小鼠体内弓形虫毒性稳定后,处死发病体征明显且病危的小鼠。用无菌生理盐水清洗小鼠腹腔并收集腹腔液,然后以 500 r/min 离心(5 min)腹腔液;取上清液再以 2 500 r/min 离心 20 min,弃上层离心液后向虫体沉淀中加入适量含 2%(体积分数)FBS 的 DMEM 并混匀,备用。

2.3.2 HeLa 细胞的培养 取 HeLa 细胞,将其培养在含 10%(体积分数)FBS 的 DMEM 中,然后加入 1 mL 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸二钠盐溶液,并置于 37 °C 培养箱中培养;将细胞悬液置于 15 mL 离心管中,以 1 000 r/min 离心 3 min。弃上清液,取适量细胞放入新的培养皿中,取适量细胞放入含 10%(体积分数)FBS 的 DMEM 中进行传代培养。

2.3.3 HeLa 细胞增殖的测定 HeLa 细胞增殖的测定采用 MTT 法。收集生长状况稳定的 HeLa 细胞,然后将 HeLa 细胞接种于 96 孔板中(每孔为 3×10^3 个细胞),并置于二氧化碳培养箱中培养 24 h 以获得单细胞层。将含 10%(体积分数)

FBS的DMEM更换为含2%(体积分数)FBS的DMEM,并在每个孔中加入5倍HeLa细胞个数的弓形虫,然后在二氧化碳培养箱内继续培养24 h.培养完成后,去掉培养液并加入不同浓度(20、200、500 $\mu\text{g/mL}$)的长白瑞香提取物以测定受试药物细胞毒性,同时以乙胺嘧啶为阳性对照,每个浓度设3个平行孔.另设正常组作为空白对照,不添加任何物质.24 h后,在孔中加入10 μL MTT溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育4 h后利用酶标仪测定各孔吸光度值($\lambda=548\text{ nm}$),并计算3个孔的平均吸光度(OD)值,以此来表示各组虫体的生长情况.

相同实验条件下,同时测定不同组别的长白瑞香提取物对未感染的HeLa细胞的细胞毒性.根据最终测定的OD值,按照式(1)计算各组细胞的抑制率(cell inhibitory rate, CIR),按照式(2)计算药物的选择性指数(selectivity index, SI).

$$CIR = \left[1 - \frac{OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白组}}}{OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}}} \right] \times 100\%, \quad (1)$$

$$SI = A_1 / A_2. \quad (2)$$

其中: A_1 和 A_2 分别为提取物对未感染弓形虫的HeLa细胞和对感染弓形虫的HeLa细胞的 IC_{50} .

3 结果与分析

3.1 长白瑞香乙醇提取物的急性毒性测定

3.1.1 小鼠体重变化及死亡率 在小鼠的急性毒性试验观察期内(14 d),各组小鼠外观正常,生长发育良好,未见有异常行为和中毒表现,且均无死亡出现.对高剂量组的小鼠进行剖检未发现肉眼可见的病变.观察期内各组小鼠体重变化如图1所示.由图1可以看出,观察期内高、低剂量组和对对照组的小鼠体重变化趋势基本一致.

3.1.2 小鼠行为学及外观观察 观察期内各实验组(高、低剂量组和对对照组)小鼠的摄食、饮水、其他活动以及粪便、毛色、皮肤等均未见异常.由此根据急性毒性分级的标准^[15]可确定长白瑞香的 LD_{50} 大于10 g/(kg·BW),属实际无毒.

3.2 长白瑞香提取物的体外抗弓形虫作用

3.2.1 HeLa细胞的生存抑制效果 图2为长白瑞香提取物对感染弓形虫后的HeLa细胞的生存抑制效果.图2采用Graphpad prism 7作图,用SPSS 24.0软件对数据进行单因素方差处理.当 $P<0.01$ 时,图中用##表示;当 $P<0.001$ 时,

图中用###表示.

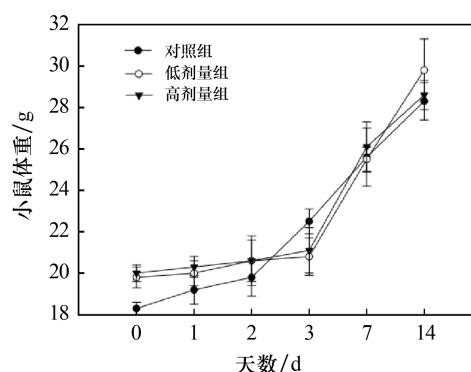


图1 3组小鼠口服长白瑞香乙醇提取物后的体重变化趋势

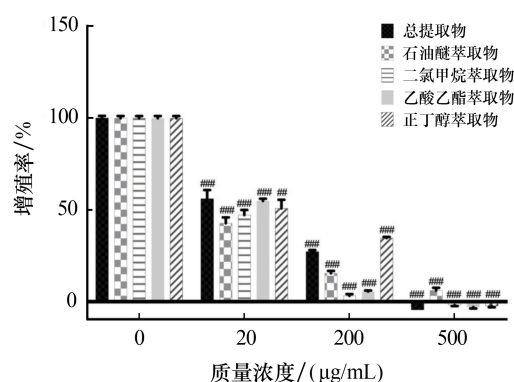


图2 长白瑞香提取物对感染后的HeLa细胞的生存抑制效果

由图2可以看出:质量浓度在20、200、500 $\mu\text{g/mL}$ 时,长白瑞香乙醇提取物及其石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取物对感染弓形虫后的HeLa细胞的生存均有抑制作用,且质量浓度在20~500 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,对感染后的HeLa细胞有剂量依赖性的抑制作用,其中二氯甲烷和乙酸乙酯萃取物的效果较为明显($P<0.001$),正丁醇萃取物在质量浓度为20 $\mu\text{g/mL}$ 时对HeLa细胞生存的抑制作用最弱($P<0.01$).

3.2.2 抗弓形虫作用的选择性 表1给出了不同组别对感染弓形虫前后的HeLa细胞的 IC_{50} 值及SI.由表1可知:二氯甲烷和乙酸乙酯萃取物对未感染弓形虫的HeLa细胞的 IC_{50} 高于对照品乙胺嘧啶对未感染弓形虫的HeLa细胞的 IC_{50} (275.2 $\mu\text{g/mL}$),表明二氯甲烷和乙酸乙酯萃取物对宿主细胞毒性较小;长白瑞香乙醇提取物及其4个萃取物的SI均高于对照品乙胺嘧啶的SI,表明长白瑞香提取物比乙胺嘧啶具有更好的抗弓形虫活性.研究^[16-19]显示,香豆素类化合物特殊的

构效关系对抗微生物活性的发挥具有重要意义,同时铁螯合剂能有效地抑制宿主细胞游离的铁离子数量,从而有效抑制弓形虫在宿主细胞内的生长,因此上述结果可能与二氯甲烷和乙酸乙酯萃取物中含有作为铁螯合剂的香豆素类化合物(瑞香素)有关。

表 1 不同组别感染弓形虫前后 HeLa 细胞的 IC_{50} 和 SI

组别	$IC_{50}/(\mu g/mL)$		SI
	未感染弓形虫	感染弓形虫	
乙胺嘧啶	275.2	237.5	1.1
乙醇提取物	234.0	149.2	1.6
石油醚萃取物	163.6	121.6	1.3
二氯甲烷萃取物	298.6	206.1	1.4
乙酸乙酯萃取物	298.7	208.2	1.4
正丁醇层萃取物	240.6	167.4	1.4

4 结论

利用长白瑞香乙醇提取物对小鼠进行急性毒性实验结果表明,长白瑞香乙醇提取物的 LD_{50} 值大于 $10 g/(kg \cdot BW)$,对小鼠无毒,因此可对长白瑞香提取物的安全性开展进一步地临床试验。长白瑞香提取物在一定程度上可阻止弓形虫在 HeLa 细胞内的增殖,抑制其对细胞的破坏,其中乙酸乙酯和二氯甲烷萃取物的效果较为明显。长白瑞香提取物对弓形虫的作用机制有待于进一步研究。本文结果可为进一步开发、利用长白瑞香提供科学依据。

参考文献:

- [1] 扈晓佳. 四种药用植物的化学成分及活性研究[D]. 上海:上海交通大学,2009.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:1 部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:161.
- [3] 扈晓佳,张卫东,柳润辉,等. 长白瑞香的化学成分及药理研究概况[J]. 药学实践杂志,2006,24(2):79-80.
- [4] 赵鹏宇,朴燕,张昌浩,等. 长白瑞香挥发性成分的 GC-MS 分析[J]. 延边大学医学学报,2019,42(1):16-19.
- [5] 杨亮,姚晓远,丁伟. 香豆素类化合物的抑菌活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2018,30(2):332-338.
- [6] HU X J, JIN H Z, SU J, et al. Chemical constituents from *Daphne koreana* Nakai[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2009,6(6):411-414.
- [7] 刘秀梅,毛焕仁,何洪春,等. 长白瑞香化学成分的研究[J]. 吉林中医药,1997,17(1):42.
- [8] 冀春茹,丁岗,冯卫生,等. 长白瑞香的化学成分[J]. 植物学通报,1994,11(3):48-49.
- [9] CHIO L C, BOLYARD L A, NASR M, et al. Identification of class of sulfonamides highly activate against dihydropteroate synthase form *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis carinii*, and *Mycobacterium avium*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1996,40(3):727-733.
- [10] ARPRON L, SOOKRUETAI B, YOSHIFUMI N. Ethanol extracts from thai plants have anti-*Plasmodium* and anti-*Toxoplasma* activities in vitro[J]. Acta Parasitologica, 2019,64(2):257-261.
- [11] AL NASR I S, KOKO W S, KHAN T A, et al. In vitro antitoxoplasmal activity of some medicinal plants[J]. Phcog Mag, 2019,15(65):568-572.
- [12] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准食品安全性毒理学评价程序:GB 15193.1—2014[S]. 北京:中国标准出版社,2014:1-6.
- [13] WANG J Z, SUN F F, TANG S S, et al. Safety assessment of vitacoxib: acute and 90-day sub-chronic oral toxicity studies[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2017,86:49-58.
- [14] SIREERATAWONG S, THAMAREE S, INKANINAN K, et al. Evaluation of acute and sub-acute oral toxicity of the ethanol extract from *Antidesma acidum* Retz[J]. African Journal of Traditional Complementary & Alternative Medicines, 2012,9(4):465-469.
- [15] World Health Organization. World Health Organization & International Programme on Chemical Safety (2010) [M]. Switzerland: WHO Press, 2010:5.
- [16] KAYSER O, KOLODZIEJ H. Antibacterial activity of simplecoumarins: structural requirements for biological activity[J]. Z Naturforsch C J Biosci, 1999,54(3/4):169-174.
- [17] 牟凌云,王琴美,倪奕昌. 瑞香素体外抗疟作用与其铁螯合能力的关系[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2002,20(2):83-85.
- [18] 黄芳,汤林华,余琳千,等. 瑞香素结构衍生物体内外抗疟活性的研究[J]. 中国病原生物学杂志,2008,3(1):35-38.
- [19] DZIADEK B, DZIADEK J, DLUGONSKA H. Identification of *Toxoplasma gondii* proteins binding human lactoferrin: a new aspect of rhoptry proteins function[J]. Experimental Parasitology, 2007,115(3):277-282.