

野菊花乙醇提取物抗烟碱毒性的研究^{*}

余科义, 赵开楼, 张帆, 柴凤兰^{**}

(河南应用技术职业学院, 郑州 450042)

摘要 目的: 研究野菊花乙醇提取物(EECI)抗烟碱毒性的生物活性。方法: 使用8周龄且体重范围从18~22 g的雌性小鼠, 以不同剂量的EECI给小白鼠灌胃, 20 min后灌胃最大致死量的烟碱溶液, 测试EECI抗烟碱毒性的效果, 计算出半数保护量PD₅₀。结果: EECI具有一定的抗烟碱毒性的生物活性, 当EECI剂量增加时, 小白鼠的存活时间得以延长, 小白鼠存活率与EECI剂量呈依赖关系, 剂量越高, 存活率越高。EECI抗最大致死量烟碱毒性的半数保护量PD₅₀为1.53 g·kg⁻¹, 其95%的可信限为1.20~1.90 g·kg⁻¹。结论: 本文报道野菊花具有抗烟碱毒性的生物活性, 拓宽了野菊花的应用范围, 为进一步从野菊花中寻找烟碱解毒药提供科学依据。

关键词: 野菊花提取物; 生物活性; 解毒药效; 抗烟碱毒性; 最大致死量; 半数保护量; 小白鼠试验

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2017)12-2209-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.12.14

Study on the anti nicotinic toxicity of ethanol extracts from Chrysanthemi Indici Flos^{*}

YU Ke-yi, ZHAO Kai-lou, ZHANG Fan, CHAI Feng-lan^{**}

(Henan Vocational College of Applied Technology, Zhengzhou 450042, China)

Abstract **Objective:** To investigate the biological activity of the ethanol extracts of Chrysanthemi Indici Flos(EECI) against nicotinic toxicity. **Methods:** Mice, which were all female and 8 weeks old, weighing from 18 g to 22 g, were fed with different doses of EECI suspension, and the absolute lethal dose of nicotine solution was given after 20 min. The effect of EECI on nicotine toxicity was tested, and the median protective dose PD₅₀ was calculated. **Results:** The EECI contained biological activity against nicotinic toxicity. The survival time of mice was prolonged when the dose of EECI was increased, and the survival rate of mice showed a dose-dependent relationship. The higher the doses, were the higher the survival rate of mice. The PD₅₀ of EECI was 1.53 g·kg⁻¹, and its 95% confidence scope was 1.20~1.90 g·kg⁻¹. **Conclusion:** This study firstly discovered the bioactivity of EECI against nicotinic toxicity, which widened the range of application of *Chrysanthemi Indici Flos* and it provided a scientific basis for the further search for nicotine antidote from these plants.

* 河南省科技厅重大科技专项资助项目(152102310326)

** 通信作者 Tel:15936250158; E-mail:384853029@qq.com

第一作者 Tel:15838346892; E-mail:yuky919zc@126.com

Keywords: ethanol extracts of Chrysanthemi Indici Flos; biological activity; detoxifying efficacy; inhibiting nicotinic toxicity; absolute lethal dose; median protective dose; experiment on white mice

吸烟有害健康,长期吸烟,容易得肺病、心血管疾病、癌症以及骨质疏松等多种疾病^[1-2]。我国当前吸烟人数超过3亿,每年有100多万人死于烟草相关疾病,超过艾滋病、结核、交通事故以及自杀等导致死亡人数的总和^[3-4]。香烟含有多种有害成分,其中烟碱(又称尼古丁)是导致烟瘾的罪魁祸首,研究烟碱的急性中毒以及积极探索降低烟碱毒副作用的药物有着重要的意义。据报道,菊科植物中华苦荬菜鲜品口服制剂对烟碱中毒家兔和小白鼠具有明显的解救作用^[5];对小鼠尼古丁急、慢性中毒有一定的拮抗作用,对尼古丁依赖的戒断症状有明显的改善作用^[6-7]。野菊花属于菊科野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序,是我国的传统中药,能清热解毒,疏风平肝^[8]。现代研究表明,野菊花具有抗菌、抗炎^[9]、抗氧化^[10]、抗肿瘤^[11-12]等作用,野菊花及复方制剂可用于预防和治疗呼吸系统、泌尿系统、皮肤等的感染性疾病,以及高血压、高血脂等^[13-14]。菊科植物具有相近的次生代谢产物以及相似的生物活性,而野菊花抑制烟碱毒性目前尚未见报道。为此作者开展了野菊花抗烟碱毒性的研究,为从野菊花中研发烟碱解毒药提供科学依据。

1 实验材料

XS105型精密电子天平(METTLER TOLEDO公司);DZG-303A型超纯水机(艾柯仪器厂);KQ-500DE型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);微量移液管(泰州为尔康医用品有限公司);小鼠灌胃器(上海玉研科学仪器有限公司)。

烟碱:无色油状液体,含量99%,密度1.01 g·mL⁻¹,由中国烟草总公司郑州烟草研究院提供,批号2015-07A。因为烟碱具有能溶于水的性质,又实验所用烟碱浓度很小,所以所配烟碱溶液溶解充分。使用前用蒸馏水配制所需浓度的烟碱稀溶液;例如:配制3.0 mg·mL⁻¹的烟碱溶液,先用微量移液管量取29.7 μL烟碱加到盛有适量蒸馏水的10 mL量瓶中,再用蒸馏水定容至刻度线,加塞摇匀即可。

野菊花乙醇提取物(ethanol extracts of *Chrysanthemi Indici Flos*, EECI):野菊花采自河南省信阳市大别山区,标本存于河南应用技术职业学院应用技术研究中心607标本室,标本号201511;将风干的300 g

野菊花研碎,加入3 L 93%的乙醇水溶液浸泡提取3次,合并提取液,减压蒸干,获得野菊花乙醇提取物(EECI)。将一定量的EECI分散于去离子水中(加CMC-Na助溶,水中含CMC-Na为0.7%),配制成不同浓度的混悬液,置于功率为800 W超声仪中,在40 ℃下超声10 min,使其分散均匀,即得EECI混悬。

实验动物:健康级(SPF)昆明种小白鼠,全雌,8周龄,体重18~22 g,由河南省实验动物中心提供。购回后分装于鼠笼中,置于20~25 ℃空调房中,标准饲料、自来水喂养,适应2~3 d后用于实验,实验前小白鼠禁食12 h,只提供充足饮水。

2 实验方法

2.1 给药方式与给药体积

用灌胃器直接给小白鼠灌胃给药,给药量标准为每10 g小白鼠单次灌胃给药量是0.25 mL。

2.2 烟碱最大致死量(LD₁₀₀)的测定

烟碱最大致死量(absolute lethal dose, LD₁₀₀)是指使小白鼠全数死亡的烟碱最低剂量。用微量移液管分别量取不同量的烟碱于10 mL量瓶中,用蒸馏水配制成不同浓度的烟碱溶液。给空腹12 h的小白鼠先灌胃去离子水,20 min后灌胃不同浓度的烟碱溶液,立即观察动物的反应,记录3 d内小白鼠死亡时间和死亡数目。随着烟碱浓度的增加,实验小白鼠反应逐渐强烈,死亡数逐渐增加。当小白鼠刚好全数死亡时的烟碱的剂量即为烟碱最大致死量LD₁₀₀。多次实验表明,染毒小白鼠在30 min内可能死亡,30 min至3 d内未见新的死亡(3 h后正常喂养)。实验测得LD₁₀₀为75 mg·kg⁻¹。再根据“2.1”项下给药体积的标准,最大致死量烟碱溶液的质量浓度为3.0 mg·mL⁻¹。

2.3 预试验

预试验的目的是测出EECI抗烟碱毒性的最大保护剂量(PD₁₀₀)和最小保护剂量(PD₀)的估计值。取准备好的25只小白鼠,随机等分成5组。照毒理学规定的程序,采用EECI剂量逐步递减法进行预试验^[15-16]。按以上所述方法配制5种不同浓度的EECI混悬液(0.25、0.20、0.13、0.06、0.03 g·mL⁻¹),依次进行实验。首先给小白鼠灌胃上述不同浓度的EECI混悬液,20 min后灌胃最大致死量的烟碱溶液(75 mg·kg⁻¹),观

察动物的反应,记录3 h内小白鼠死亡数目。预试验确定 PD_{100} 为 $6.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, PD_0 为 $0.625 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.4 正式试验

2.4.1 分组与剂量 分组以4~9组为宜,本次正式实验分为8组。再根据预试验结果,按照毒理学的计算公式^[17-18]和实验组数,首先计算出相邻两组剂量的组距*i*: $i = (\lg PD_{100} - \lg PD_0) / (n-1)$,代入数据得到 $i = (\lg 6.25 - \lg 0.625) / 7 = 0.143$,再计算出相邻两组剂量的公比*d*: $d = \log^{-1} i = 1.39$ 。分组与剂量如表1所示。

表1 动物分组与EECI的剂量

Tab. 1 Groups of animals and dose of EECI

组别 (group)	样品用量 (sample dosage)	EECI剂量 (EECI dose)/(g·kg ⁻¹)
1	a	0.625
2	ad	0.87
3	ad ²	1.21
4	ad ³	1.68
5	ad ⁴	2.34
6	ad ⁵	3.25
7	ad ⁶	4.51
8	ad ⁷	6.27

注(note): a. PD_0 时样品用量(sample dosage when PD_0); d. 相邻两组剂量的公比(the common ratio of dose between two adjacent groups)

2.4.2 给药方案 将90只小白鼠随机等分成9组,每组10只,分别为1个对照组和8个实验组,以去离子水为对照组,正式试验的剂量如表1,方法同预试验。

2.4.3 半数保护剂量(PD_{50})的计算 以Bliss法为原理,运用SPSS(Statistical Package for the Social Science)软件编辑运算^[19],得到本次实验EECI抗最大致死量烟碱毒性的半数保护量 PD_{50} 和95%可信限。

3 结果

对照组小白鼠烟碱中毒后,出现兴奋,呼吸急促,尾巴高高翘起,沿着鼠笼不停跑动,身体抽搐,其中有2只口中流血,最后全部死亡。而实验组小白鼠中毒症状有所缓解,存活小白鼠数随EECI剂量的增加而增加。能够存活的小白鼠开始时活动减少,身体萎缩,随后活动逐渐增加,1~3 h活动正常。特别是EECI高剂量的6、7、8组,小白鼠中毒症状轻微,没有出现强烈的兴奋、呼吸困难、翘尾、抽搐等现象,且在5~15 min内症状缓解,随后逐渐趋于平稳,1 h后活动正常,觅食,没有发现死亡现象。实验结果如表2所示。

表2 EECI抗烟碱毒性的动物实验结果

Tab. 2 The results of animal experiments about EECI against nicotine toxicity

组别 (group)	EECI剂量 (EECI dose)/(g·kg ⁻¹)	小鼠数 (animal number)/只	烟碱剂量 (nicotine dose)/(mg·kg ⁻¹)	死亡时间 (death time)/min	死亡数 (deaths number)/只	存活率 (survival rate)/%
对照组(control)	0	10	75	1~4	10	0
1	0.625	10	75	1~4	10	0
2	0.87	10	75	1~4	8	20
3	1.21	10	75	2~5	6	40
4	1.68	10	75	2~6	4	60
5	2.34	10	75	4~8	2	80
6	3.25	10	75	8	1	90
7	4.51	10	75	6	1	90
8	6.27	10	75	—	0	100

通过计算,本次实验EECI抗烟碱毒性的半数保护量 PD_{50} 为 $1.53 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,其95%可信限为1.20~1.90 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

4 讨论

实验结果表明,染毒小白鼠的存活时间随EECI剂量增加而延长,小白鼠的存活率与EECI剂量呈依

赖关系,剂量越高,小白鼠存活率越高,最终完全抑制烟碱毒性。EECI半数保护量PD₅₀为1.53 g·kg⁻¹,95%可信限为1.20~1.90 g·kg⁻¹。EECI具有抗烟碱毒性的生物活性。

野菊花含有挥发油、萜类、黄酮类等多种化学成分^[20~22],临床多用于治疗高血压、高脂血、肿瘤等症,以及泌尿生殖系统感染、急慢性呼吸道感染、急性乳腺炎、急性感染性肝炎以及急性淋巴管炎等各种感染性疾病,预防流行性脑膜炎、感冒也有一定作用^[23~25]。本文首次报道野菊花具有抗烟碱毒性的生物活性,拓展了野菊花的应用范围,为进一步从中药野菊花中寻找烟碱解毒药提供了科学依据。同时作者也认识到,本文研究PD₅₀数值是一个统计学估计值,受实验动物、样品的溶解度、操作人员的操作技能等方面的影响。作者前期研究发现,菊科植物的萜类成分具有抗尼古丁毒性的生物活性^[26],推测野菊花具有抗烟碱毒性的活性物质可能是萜类,其具体的活性化学物质及其解毒机理有待于进一步探索。

参考文献

- [1] 李建华.吸烟对人体健康主要危害的研究进展[J].国际内科学杂志,2008,35(5):248
- LI JH. Research progress on the major health hazards of smoking [J]. Int J Intern Med, 2008, 35 (5): 248
- [2] MATHERS CD, LONCAR D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030 [J]. Plos Med, 2006, 3 (11): 442
- [3] 中华人民共和国卫生部:中国吸烟危害健康报告[EB/OL].
<https://wenku.baidu.com/view/0d05ae3367ec102de2bd8965.html>, 2012-05-31/2016-10-10
Ministry of Health of the PRC : China Reported Health Hazards of Smoking [EB/OL]. (2012-05-31) [2016-10-10]. <https://wenku.baidu.com/view/0d05ae3367ec102de2bd8965.html>
- [4] PETO R, CHEN ZM, BOREHAM J. Tobacco: the growing epidemic in China [J]. CVD Prev Contr, 2009, 4 (1): 61
- [5] 赵云玲,李华洲.中华苦荬菜抗烟碱作用研究[J].动物毒物学,2003,18(1):69
- ZHAO YL, LI HZ. Study on anti-nicotine effect of *Ixeridium chinensis* [J]. Anim Toxicol, 2003, 18 (1): 69
- [6] 张玉芬.中华苦荬菜对小鼠尼古丁中毒的影响及戒断作用研究[D].保定:河北农业大学,2014
- ZHANG YF. The Effect of *Ixeris Chinensis* on Nicotine Poisoning and Withdrawal in Mice [D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2014
- [7] 张玉芬,赵文,韩丽萍,等.苦荬菜对尼古丁中毒小鼠血清乙酰胆碱含量的影响[J].食品工业科技,2014,35(3):336
- [8] ZHANG YF, ZHAO W, HAN LP, et al. The effects of *Ixeris chinensis* (Thunb.) Nakai on acetylcholine content in nicotine poisoning mouse [J]. Sci Tech Food Ind, 2014, 35 (3): 336
- 南京中医药大学.中药大辞典.下册[M].第二版.上海:上海科学技术出版社,2006: 3124
- Nanjing University of Chinese Medicine. Traditional Chinese Dictionary. Part II [M]. 2nd Ed. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishers, 2006: 3124
- [9] 张振亚,万学平,刁志花,等.野菊花提取物抑制呼吸道合胞病毒作用的体外实验研究[J].解放军药学学报,2006,22(4):273
- ZHANG ZY, WAN XP, DIAO ZH, et al. Anti-respiratory syncytial virus effect of the extraction of *Chrysanthemum indicum**in vitro* [J]. Pharm J Chin PLA, 2006, 22 (4): 273
- [10] 严亦慈,娄小娥,蒋慧娣,等.野菊花水提液抗氧化作用的实验研究[J].中国现代应用药学,1999,6(6):16
- YAN YC, LOU XE, JIANG HD, et al. Experimental studies on the anti-oxidation effects of water extract from *Chrysanthemum indicum*L. [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 1999, 6 (6): 16
- [11] 金沈锐,祝彼得,秦旭华,等.野菊花注射液对人肿瘤细胞SMMC7721、PC3、HL60增殖的影响[J].中药药理与临床,2005,21(3):39
- JIN SR, ZHU BD, QIN XH, et al. Effect of chrysanthemum injection on SMMC7721, PC3 and HL60 in human tumor cells [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2005, 21 (3): 39
- [12] YASUKAWA K, AKIHISA T, OINUMA H, et al. Inhibitory effect of di- and trihydroxy triterpenes from the flowers of compositae on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice [J]. Biol Pharm Bull, 1996, 19 (10): 1329
- [13] 刘菊芳,朱巧贞,钱名堃,等.治疗高血压药物的研究Ⅷ.野菊花成分HC-1的实验治疗及毒性[J].药物学报,1962,9(3):151
- LIU JF, ZHU QZ, QIAN MK, et al. Treatment of hypertensive drugs VIII. Experimental treatment and toxicity of wild *Chrysanthemum constituents* HC-1 [J]. Acta Pharm Sin, 1962, 9 (3): 151
- [14] 蔡华芳.野菊花的化学成分及药用研究进展[J].中国医疗研究前沿,2007,2(18):118
- CAI HF. The research progression of *Flos Chrysanthemi Indici* on chemical constituent and medicinal application [J]. Chin Health Innov, 2007, 2 (18): 118
- [15] 沈建中.动物毒理学[M].北京:中国农业出版社,2011: 90
- SHEN JZ. Animal Toxicology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2011: 90
- [16] 王必尊,盛占武,王会,等.香蕉花及其提取物的急性毒性评价[J].食品工业科技,2014,35(4):338
- WANG BZ, SHENG ZW, WANG H, et al. Acute toxicity evaluation of banana flower and its extracts [J]. Sci Technol Food Ind, 2014, 35 (4): 338
- [17] 陈爽,侯振中,管延杰,等.亚硒酸钠对小鼠的半数致死量测定

- [J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(3): 91
- CHEN S, HOU ZZ, GUAN YJ, et al. Determination of median lethal dose of sodium selenite in mice [J]. J Northeast Agric Univ, 2012, 43(3): 91
- [18] 朱蓓蕾. 动物毒理学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1989: 257
- ZHU BL. Animal Toxicology [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishers, 1989: 257
- [19] 周一平. 用 SPSS 软件计算新药的 LD₅₀ [J]. 药学进展, 2003, 27(5): 314
- ZHOU YP. The calculation of LD₅₀ in new drugs with software SPSS [J]. Prog Pharm Sci, 2003, 27(5): 314
- [20] 张永明, 黄亚非, 陶玲, 等. 不同产地的野菊花挥发油化学成分比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(4): 265
- ZHANG YM, HUANG YF, TAO L, et al. Chemical components of essential oils from Flos Chrysanthemi Indici in different areas [J]. China J Chin Mater Med, 2002, 27(4): 265
- [21] 于德泉, 谢凤指. 野菊花化学成分的研究 [J]. 药学学报, 1987, 22(11): 837
- YU DQ, XIE FZ. Studies on the chemical constituents of *Chrysanthemum indicum* L. [J]. Acta Pharm Sin, 1987, 22(11): 837
- [22] 钱名堃. 野菊花的成分研究(第二报). 野菊花内酯的化学结构 [J]. 药学学报, 1963, 10(3): 129
- QIAN MK. Studies on the constituents of YE-JU-HUA, the flower of *Chrysanthemum indicum* L. (II) The structure of Yejuhua lactone [J]. Acta Pharm Sin, 1963, 10(3): 129
- [23] 石兰萍, 田琳琳, 袁劲松, 等. 野菊花的研究概况 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2005, 3(5): 434
- SHI LP, TIAN LL, YUAN JS, et al. The overview on the research of Flos Chrysanthemi [J]. Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovasc Dis, 2005, 3(5): 434
- [24] UKIYA M, AKIHISA T, TOKUDA H, et al. Constituents of compositae plants III. Anti-tumor promoting effects and cytotoxic activity against human cancer cell lines of triterpene diols and triols from edible Chrysanthemum flowers [J]. Cancer Lett, 2002, 177(1): 7
- [25] 吴钉红, 杨立伟, 苏薇薇. 野菊花化学成分及药理研究进展 [J]. 中药材, 2004, 27(2): 142
- WU DH, YANG LW, SU WW. Progress on chemical composition and pharmacology activities of *Chrysanthemum indicum* [J]. J Chin Med Mater, 2004, 27(2): 142
- [26] 余科义. 中药旋覆花治疗心血管疾病的活性成分研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2014
- YU KY. Investigation of the Active Compounds in Traditional Chinese Medicine *Inula* for the Treatment of Cardiovascular Diseases [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2014

(本文于 2017 年 1 月 3 日收到)