

螺光黑壳菌酮 A 腹腔注射对昆明小鼠半数致死量的测定

李 兵¹, 陈晓光², 陈晓梅¹, 郭顺星¹, 王春兰¹

(1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所 北京 100193;
2. 中国医学科学院 北京协和医学院药物研究所 北京 100050)

【摘要】 目的 用寇氏法测定螺光黑壳菌酮 A 腹腔注射对昆明小鼠的半数致死量 (median lethal dose, LD₅₀)。方法 实验动物为啮齿昆明小鼠 雌雄各半 体重(20 ± 2) g。用序贯法摸索出受试物的全死剂量 而后设置 5 个剂量组 剂量比值 r = 1.25 (或 0.80)。一次性腹腔注射黑壳菌酮 A 后 连续观察 10 d 统计各组死亡情况并计算半数致死剂量。结果 各组小鼠均出现不同程度的腹腔刺激反应 雌性比雄性反应更强烈且呈剂量依赖性, 30 min 后刺激基本消失; 受试物腹腔注射 LD₅₀ 为 5.35 mg/kg 其 95% 可信区间为 4.69 ~ 6.11 mg/kg。结论 螺光黑壳菌酮 A 的 LD₅₀ 为 5.35 mg/kg 死亡率呈剂量依赖性。

【关键词】 螺光黑壳菌酮 A; 急性毒性; 半数致死量

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2013) 07-0025-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2013.007.006

Determination the median lethal dose to kunming mouse of Spiroreussione A by intraperitoneal injection

LI Bing¹, CHEN Xiao-guang², CHEN Xiao-mei¹, GUO Shun-xing¹, WANG Chun-lan¹

(1. The Institute of Medicinal Plant Development of Chinese Academy of Medical Sciences Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. Institute of Material Medical of Chinese Academy of Medical Sciences Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective Karber's method was applied to test the median lethal dose (LD₅₀) of Spiroreussione A in KM mice by intraperitoneal injection. **Methods** KM mice which half is male and another half is female were used to measure 100% lethal dose by Sequential method first, the rest was divided into 5 groups randomly. The ratio of high dose group and low dose group is set up as 1.25 (or 0.8). Then the KM mice were administered Spiroreussione A at different dosages through intraperitoneal injection. Toxicity symptoms and times of death of the mice were recorded, and LD₅₀ of Spiroreussione A on mice was calculated. **Results** Different degrees of peritoneal irritation were observed in each group and it was more significant in female than male. The peritoneal irritation disappeared after 30 min. The LD₅₀ of Spiroreussione A was 5.35mg/kg, 95% confidence interval was (4.69 ~ 6.11) mg/kg. **Conclusion** This experiment showed that the LD₅₀ of Spiroreussione A is 5.35 mg/kg and the mortality is dose-dependent.

【Key words】 Spiroreussione A, Acute toxicity, Median lethal dose

[基金项目]“重大新药创制”科技重大专项 项目编号: 2012ZX09301002-001-032。

[作者简介]李兵,男,中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所硕士研究生,主要从事天然产物化学及药理学研究, E-mail: zudengtianxia@126.com.

[通讯作者]王春兰,女,硕士生导师,中国医学科学院 北京协和医学院教授,主要从事药用兰科植物天然产物化学研究, E-mail: wangchunlan2006@163.com.

螺光黑壳菌酮 A 是从白木香内生真菌(*Preussia* sp) 发酵液中分离出的天然产物,此化合物结构新颖, YE Yang 等^[1]将其划归为螺环酚类。体外抗肿瘤实验表明,该化合物对肝癌细胞株 Bel7404 和卵巢癌细胞株 A2780 具有较好的细胞毒性^[2]。近期动物体内实验发现,此化合物还具有一定的体内抗肿瘤活性。然而与其它抗肿瘤药物一样,此类药物也难免对机体产生或多或少的毒副作用,甚至导致受试动物死亡。鉴于此药物具有一定的体内抗肿瘤活性,且拟用于人体的药物通常需要进行动物急性毒性试验,因而有必要对螺光黑壳菌酮 A 的半数致死量(LD₅₀) 进行研究^[3]。

LD₅₀是指在动物急性毒性实验中,使受试动物半数死亡所需受试化合物等的剂量,它是一个经过统计学处理计算得出的数值,通常以有毒物质质量与实验生物体质量的比值表示,如 mg/kg 等。LD₅₀主要目的有二:一是评价单次给药引起受试动物重大不良反应或危及生命的毒性剂量,二是确定受试物可能的急性毒性靶器官。一般而言,人们先通过序贯法(up-and-down)摸索出受试物的 100% 致死剂量^[4],而后在此基础上设置不同的剂量组和组间距,采用一种或者多种给药途径^[5],一次给药啮齿动物,而后连续观察不少于 7d,记录病理表现和死亡情况,最后统计分析得出半数致死量^[6-7]。

1 材料和方法

1.1 实验材料

无水乙醇(EtOH) 购于北京化工厂,聚乙二醇 400(PEG400) 由陇西化工股份有限公司提供,医用 0.9% 氯化钠注射液(500mL) 来源于石家庄四药有限公司。将 EtOH、PEG400 和 0.9% 氯化钠注射液按体积比 1:4:15 的比例混匀,配制成溶媒或药物稀释液。1mL 和 200 μ L 移液枪购于 Eppendorf 公司。电子天平 MP6001 购于上海宇恒平科学仪器有限公司。受试物螺光黑壳菌酮 A 通过大孔吸附树脂富集纯化后 Waters 制备色谱仪制备而成,纯度 98%。

1.2 受试动物

本实验选用昆明小鼠作为受试动物,体重在(20 \pm 2)g 范围内,SPF 级别,雌雄各半,由中国军事医学科学院实验动物中心提供,许可证号【SCXK-(军)2007-004】。

1.3 实验方法

1.3.1 确定剂量实验

螺光黑壳菌酮 A 不溶于水,本实验以 EtOH:

PEG400:0.9% 生理盐水按体积比 1:4:15 的比例溶解受试物,低剂量组用稀释液稀释至相应剂量。

取 20 只 KM 小鼠随机分成 5 组(4 个剂量组和 1 个溶媒对照组),每组 4 只,雌雄各半,分放于 10 个鼠笼内。按 0.20mL/10g 剂量一次性腹腔注射螺光黑壳菌酮 A 溶液,给药剂量分别为 50.0, 20.0, 10.0 和 5.00 mg/kg。给药后连续观察 10d,记录实验小鼠死亡情况。实验结果如表 1。

表 1 初试实验结果

组别 Groups	剂量(mg/kg, ip.) Dose (mg/kg, ip.)	总数/死亡数 (Total/Dead)	致死率(%) (Mortality)
1	50.0	4/4	100
2	20.0	4/4	100
3	10.0	4/4	100
4	5.00	4/2	50.0
5	溶媒	4/0	0

由表 1 可以看出,腹腔注射螺光黑壳菌酮 A 致死量相对较小,给药剂量降到 10.0 mg/kg 时,致死率仍为 100%。剂量再降低一半时,仍有一半的死亡率。最终将给药剂量上限定为 8.00 mg/kg,组间剂量比值 r 设为 1.25(或 1/r=0.80),设置 5 个剂量组,于是各剂量组给药量从高到低分别为:第 1 剂量组 8.00 mg/kg,第 2 剂量组 6.40mg/kg,第 3 剂量组 5.12 mg/kg,第 4 剂量组 4.10 mg/kg,第 5 剂量组 3.28 mg/kg。按 0.20 mL/10g 计算给药量,一次性腹腔注射给药,进行正式试验。

1.3.2 半数致死量实验

昆明小鼠 SPF 级动物房适应一天,而后随机分成 5 组,第一剂量组(8.00 mg/kg) 12 只(其中雄性每组 6 只、雌性每组 6 只);其余每组 10 只(其中雄性每组 5 只、雌性每组 5 只,且每组体重没有显著性差别),挂上标牌后分笼饲养。所有小鼠都采用一次性腹腔注射方式给药,给药量按 0.20 mL/10 g 计。腹腔注射给药后,连续观察 10d,记录各组别小鼠死亡情况。对死亡和未死亡的小鼠进行初步的病理解剖,观察体内脏器病变情况。

1.3.3 统计方法

应用 SPSS Statistics 13.0 软件统计分析处理数据,进行 Probit 回归法拟合得出回归方程和计算螺光黑壳菌酮 A 的半数致死量,用 χ^2 检验法检验回归方程拟合优度。并 Origin Lab 8.0 软件统计分析并做出 Dose-Response 曲线。

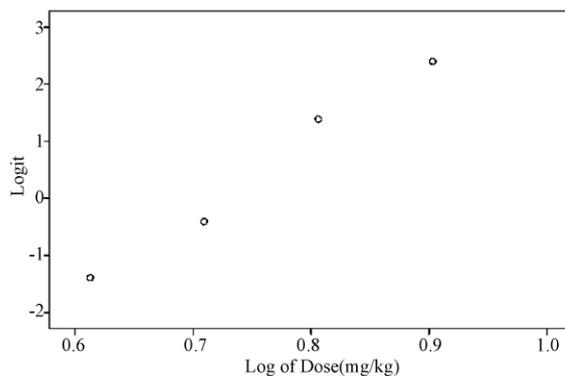
2 实验结果与分析

腹腔注射给药后,最大剂量组 8.00 mg/kg 的小

鼠都出现腹腔刺激且较为严重,30 min 后刺激减轻,小鼠靠拢蜷缩、活动减少、皮毛有些树立发叉,雌性比雄性反应强烈;以后剂量组腹腔刺激反应依次减轻,至第四剂量组 4.10 mg/kg 时基本没有腹腔刺激,最低剂量组 3.28 mg/kg 给药后一切正常。给药后的 3 d 内,一些小鼠陆续死亡。第四天后,存活小鼠慢慢恢复正常。统计结果如表 2 所示。

用 SPSS Statistics 13.0 对死亡率 (Mortality) 与剂量 (Dose) 进行 Probit 回归分析,验证数据并计算 LD₅₀ 值。软件分析显示 $\chi^2 = 0.799$ 和 $P = 0.850$,表明数据可靠,Probit 与对数剂量之间有很好的线性关系,线性方程为 $PROBIT = -11.234 + 15.425X$ 。点分布如图 1 所示。此法计算出的 LD₅₀ = 5.35 mg/kg,在 95% 的置信区间内的剂量范围为 4.69 mg/kg ~ 6.11 mg/kg。此外,从统计结果中也可以看出 LD₅ = 3.45 mg/kg,在 95% 的置信区间内的剂量范围为 2.18 mg/kg ~ 4.10 mg/kg; LD₉₅ = 8.30 mg/kg,在 95% 的置信区间内的剂量范围为 6.97 mg/kg ~ 13.2 mg/kg。

除此之外,也用 Origin Lab 8.0 做出 Mortality-Dose 或 Mortality-LgDose 关系图。如图 2 所示。两组图清楚的表明死亡率与是剂量依赖性的,从图 2. A 图可以看出,所有点均匀的分布在曲线的两侧,整条曲线呈不对称的“S”型,曲线后端有些明显的拖尾,曲线中断切线斜率最大变化趋势最明显,此时半数致死量为 5.32mg/kg。将剂量取对数,然后做出 Mortality-LgDose 曲线,此曲线是一条较为对称



注:寇氏法测定受试物螺光黑壳菌酮 A 腹腔注射对昆明小鼠的半数致死剂量。5 组小鼠腹腔注射不同剂量的该化合物,连续观察 10 天并统计死亡情况。SPSS 13.0 进行概率 (Probit) 模型分析,得出 Logit 对对数剂量的散点分布图且散点均匀分布。

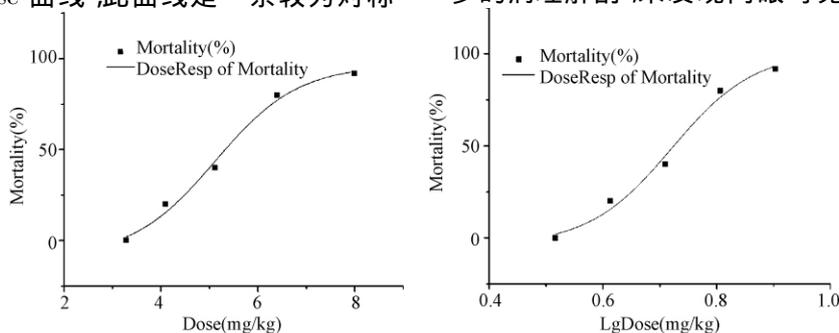
图 1 致死率与剂量 Logit 转化散点图

Note: Karber's method was applied to test LD₅₀ of Spiroreussione A on KM mice by ip. Different dosages were given on five groups, and observed for 10 days continuously, and recorded the deaths. The scatter plot of Logit to LgDose was obtained by probability model analysis (Probit) with SPSS 13.0. These scatters were distributed uniformly.

Fig. 1 Scatter Plot of Logit to LgDose

的“S”型曲线,对称点 (0.725, 50.0) 即为 LD₅₀ 对应的点,如图 2. B 所示。两种方法得出的 LD₅₀ 值无显著性差别。

从表 2 还可以看出,未死亡小鼠体重可以慢慢恢复,但还是存在一定的毒性。对死亡个体进行初步的病理解剖,未发现肉眼可见的脏器病变,腹腔



注: A: 寇氏法测定受试物螺光黑壳菌酮 A 腹腔注射对昆明小鼠的半数致死剂量。5 组小鼠腹腔注射不同剂量的该化合物,连续观察 10 天并统计死亡情况。Origin Lab 8.0 软件绘制出致死率 (Mortality) 对剂量 (Dose) 的不对称“S”曲线图。B: 将剂量取对数,得致死率 (Mortality) 对对数剂量 (LgDose) 的对称“S”型曲线图,其对称点 (0.725, 50.0) 即为 LD₅₀ 点。

图 2 死亡率与剂量依赖性曲线图

Note: A: Karber's method was applied to test LD₅₀ of Spiroreussione A on KM mice by ip. Different dosages were given on five groups, and observed for 10 days continuously, and recorded the deaths. An asymmetrical “S” curve Mortality to Dose was drew by Origin Lab 8.0. B: After taken doses logarithm, a symmetrical “S” curve Mortality to LgDose was obtained and the symmetry point (0.725, 50.0) was its LD₅₀ point.

Fig. 2 The “S” curves of mortality to dose of Spiroreussione A

表 2 螺光黑壳菌酮 A 的 LD₅₀ 实验结果
Tab. 2 The LD₅₀ experiment results of Spiropreussione A

分 组 Groups	数量(只) Num.	开始体重 (g) Initial weight	给药量 (mg/kg, ip.) Dose	结束体重 (g) Terminal weight	死亡量(只) Dead	死亡率(%) Mortality
1	♂ 6	20.6 ± 0.654	8.00	34.1	5	91.7
	♀ 6	20.6 ± 0.669		\	6	
2	♂ 5	21.2 ± 0.832	6.40	28.0	4	80.0
	♀ 5	20.3 ± 0.316		27.1	4	
3	♂ 5	20.4 ± 0.416	5.12	29.2 ± 1.92	2	40.0
	♀ 5	20.9 ± 0.870		27.7 ± 1.33	2	
4	♂ 5	20.9 ± 1.27	4.10	28.1 ± 0.907	2	20.0
	♀ 5	20.8 ± 0.709		25.5 ± 1.51	0	
5	♂ 5	20.4 ± 0.476	3.28	32.5 ± 2.88	0	0
	♀ 5	20.8 ± 1.09		28.7 ± 0.713	0	

内也没有残留的未被吸收的受试物——螺光黑壳菌酮 A 致死原因不明。连续观察 10d, 脱臼处理后解剖发现, 个别小鼠肠与腔壁存在一些粘连, 还有个别小鼠肠有些类似发炎的症状, 其余小鼠正常; 所有小鼠均没有肉眼可见的脏器性病变。

3 讨论

具有体内外抗肿瘤活性的螺光黑壳菌酮 A 对啮齿动物昆明小鼠具有一定的毒性。对实验数据进行统计分析, 最终得出螺光黑壳菌酮 A 腹腔注射的半数致死量为 5.35 mg/kg, 95% 置信范围为 4.69 ~ 6.11 mg/kg。然而, 受动物房饲养条件、动物个体差异、操作误差以及实验动物数量等条件的影响, LD₅₀ 值不是一个定值, 更不是受试物的生物学常数, 只能作为后续实验的参考^[8]。Gleason 和 Ellison 等将化学物质进行了分类, LD₅₀ 在 5.00 ~ 50.0 mg/kg 范围内的属于非常毒化合物^[9], 螺光黑壳菌酮 A 就在此范围内, 据此可以推测该化合物可能是细胞毒类抗肿瘤化合物。

螺光黑壳菌酮 A 具有一定的腹腔刺激性, 个别小鼠解剖后发现肠道炎症和肠壁粘连, 它是由腹腔刺激性导致还是螺光黑壳菌酮 A 的毒性还需要做更深的病理研究。除此之外, 该化合物没有引发肉眼可见的脏器性病变。一般而言, 抗肿瘤药物的有效性是其众多矛盾的主要方面, 解决其腹腔毒性或可以通过结构修饰、剂型调整等途径, 以寻求一个较为理想的结合点。

螺光黑壳菌酮 A 是已文献报道 Palmarumycin CP1 系列化合物的类似物, 其体外抗肿瘤活性与 Palmarumycin CP1 类似, 体内抗肿瘤活性也较好, 抗肿瘤谱具有一定的差异^[10]。目前实验初步表明螺

光黑壳菌酮 A 是细胞毒类抗肿瘤化合物, 但其它的抗肿瘤作用机理如诱导细胞凋亡、抑制肿瘤新生血管生成等也具有探索的价值和空间, 此外它是否具有与 Palmarumycin CP1 一样具有硫氧还原蛋白酶 (thioredoxin reductase) 抑制活性也有待进一步的去证实。总之, 该化合物具有一定的开发前景。

参考文献:

- [1] Yang YE, Xi-Qiang LI, Chun-Ping TANG. Natural Products Chemistry Research 2009's Progress in China [J]. Chinese Journal of Natural Medicines. 2011, 9(1): 0007-0016.
- [2] Xiaomei Chen, Qiyuan Shi, Shunxing Guo, et al. Spirobisnaphthalene Analogues from the Endophytic Fungus *Preussia* sp. [J]. J Nat Prod. 2009, 72: 1712-1715.
- [3] CDER, FDA. Guidance for industry: single dose acute toxicity testing for pharmaceuticals (Final). 1996.
- [4] OECD. Guideline 425: Acute Oral Toxicity-Up and Down Procedure. OECD Guidelines for testing of chemicals. 2001.
- [5] 梁磊, 张绪慧, 王晓燕, 等. 腹腔注射槐定碱的急性毒性实验 [J]. 时珍国医国药. 2002, 22(5): 1252-1253.
- [6] Finney D. J. The median lethal dose and its estimation [J]. Arch Toxicol. 1985, 56: 215-218.
- [7] 国家食品药品监督管理局. 化学药物急性毒性试验技术指导原则, 1995.
- [8] Sperling F. Nonlethal parameters as indices of acute toxicity: inadequacy of the acute LD₅₀ [M]. John Wiley and Sons, New York London Sydney Toronto. 1976, 177.
- [9] Zbinden G. and Flury-Roversi M. Significance of the LD₅₀-Test for the Toxicological Evaluation of Chemical Substances [J]. Arch Toxicol. 1981, 47: 77-99.
- [10] Powis G. Wipf P. Stephen M. L. et al. Molecular pharmacology and antitumor activity of palmarumycin-based inhibitors of thioredoxin reductase [J]. Mol. Cancer Ther. 2006, 5(3): 630-636.

(修回日期) 2013-04-26