

以 Lorke 法为基础的半致死剂量分析法在油酸和化香树果序及黄连素抗镉减毒评价中的应用

房志家^{1,2,3,4} 孙力军^{1,2,3,4}* 王雅玲^{1,2,3,4} 刘颖^{1,2,3,4} 聂芳红^{1,2,3,4}

(¹广东海洋大学食品科技学院,广东湛江 524088; ²广东省水产品加工与安全重点实验室; ³广东省海洋食品工程技术研究中心;

⁴水产品深加工广东普通高等学校重点实验室)

摘要 镉污染严重威胁着农业的健康发展,如何有效抗镉减毒是保障农业生产安全的重要措施。然而,目前缺乏高效的抗镉药物及简便易行的评价方法。本试验借助 Lorke 法为基础的半致死剂量(LD₅₀)分析方法,检测了油酸、化香树果序、黄连素等不同潜在的抗镉化合物的减毒作用。通过改良后的 Lorke 法测定不同抗镉药物对小鼠的经口镉 LD₅₀ 的影响。结果表明,与 200 mg/kg V_c 相比,灌胃 200 mg/kg 油酸、化香树果序、黄连素能够减轻镉的毒性,提高镉的 LD₅₀。LD₅₀ 由 140~160 mg/kg 分别上升至 300~320 mg/kg(油酸组)、280~300 mg/kg(化香树果序组)和 320~340 mg/kg(黄连素组)。以上结果表明,以 Lorke 法为基础的 LD₅₀ 分析方法,能够评价出油酸、化香树果序、黄连素的减毒作用及其剂量-效应关系。以上结果同时证明了相同剂量下黄连素效果要优于油酸、优于化香树果序。

关键词 镉毒性;油酸;黄连素;化香树果序;半致死剂量

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 1007-5739(2019)09-0202-02

Application of LD₅₀ Analysis Method in Evaluation of Oleic Acid, *Platycarya strobilacea* Caryopsis and Berberine on Resistance and Attenuation of Cadmium Toxicity Based on Lorke Method

FANG Zhi-jia^{1,2,3,4} SUN Li-jun^{1,2,3,4}* WANG Ya-ling^{1,2,3,4} LIU Ying^{1,2,3,4} NIE Fang-hong^{1,2,3,4}

(¹ College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang Guangdong 524088; ² Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety; ³ Guangdong Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Food; ⁴ Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution)

Abstract Cadmium pollution is a serious threat to the development of agriculture, control and reduction of cadmium is an important way to ensure the safe of agricultural production. However, effective methods for controlling and evaluating cadmium toxicity are not available currently. To effectively reduce the toxic and adverse effects caused by cadmium, the LD₅₀ analysis method based on Lorke method was used to evaluate the attenuating effect of oleic acid, *Platycarya strobilacea* caryopsis and berberine on cadmium toxicity. The modified Lorke method was used to determine the effects of different anti-cadmium drugs on transoral cadmium LD₅₀ in mice. The results showed that 200 mg/kg of oleic acid, *P. strobilacea* caryopsis and berberine could reduce the toxicity of cadmium and increase the LD₅₀ of cadmium in mice compared with 200 mg/kg of vitamin C. Their LD₅₀ of cadmium rose to 300~320 mg/kg, 280~300 mg/kg and 320~340 mg/kg, respectively. The results indicated that the LD₅₀ analysis based on Lorke method was feasible to evaluate the attenuating effect of oleic acid, *P. strobilacea* caryopsis and berberine on cadmium toxicity, as well as the relationship between dose and effect. The results also proved that the attenuating effect of berberine on cadmium toxicity was better than that of oleic acid and *P. strobilacea* at the same dose.

Key words cadmium toxicity; oleic acid; berberine; *Platycarya strobilacea* caryopsis; median lethal dose

工业发展在推动农业生产的同时,也带来镉等极具破坏性的污染物^[1-3]。镉严重损害作物生长,更严重损害动物肝肾功能,导致脏器损伤^[4],产生极强的毒副作用^[5-6]。如何有效降低镉对畜牧业的影响是农业部门关注的重点问题^[7]。

半致死剂量(LD₅₀)作为评价毒物毒性的重要指标,在毒物毒性评价、联合用药安全性方面有着重要的应用价值。即使在不同毒物之间、不同动物之间,根据 LD₅₀ 同样能够评价出毒物的毒性强弱变化。然而,试验动物作为食品、药品评价中的“活天平”,在精确评价药物的毒性时,往往需要牺牲大量动物进行反复检测才能评价出毒性强弱。如常规的 LD₅₀ 测定试验通常需要小鼠 70 只左右^[8],霍恩氏(Horn)法需要 40 只小鼠,孙瑞元改良的寇氏(Karbor)法一般也需 30 只左右的小鼠^[9],而使用试验动物最少的小鼠 Lorke 法仅需 13 只小鼠^[10]。

本试验以使用试验动物最少的小鼠 Lorke 法为基础,并以本团队前期发现的油酸等抗镉化合物作为试验药物^[11],以期降低镉污染的影响提供有益数据,并拓展以 Lorke 法为基础的 LD₅₀ 分析法在毒性评价中的应用。

基金项目 国家自然科学基金(31701706);广东省高等学校创新强校项目(GDOU2019040203)。

作者简介 房志家(1986-),男,湖南桂阳人,博士,讲师。研究方向:食品质量与安全。

* 通信作者

收稿日期 2019-01-08

1 材料与方法

1.1 试验动物及主要试剂

试验所用小鼠为 SPF 级昆明小鼠(约 30 g),购于广东广州中医药大学试验动物中心。氯化镉(>99%, AR 级)、油酸(AR 级)、盐酸黄连素(>99%, CP 级别)、V_c(>99%, USP 级)等,购于上海生物工程有限公司。

1.2 以 Lorke 法为基础的 LD₅₀ 急性毒性试验

1.2.1 LD₅₀ 剂量范围试验。基于 Lorke 法^[10],将新购买的小鼠适应性饲养 7 d 后,随机分成 3 个不同的药物组和 2 个对照组,每个药物组包含低、高 2 个剂量。每个药物组的小鼠给予灌胃 30、100、300 mg/kg 氯化镉,每个剂量 3 只小鼠。每个药物组 18 只小鼠,对照组为 9 只小鼠,每个剂量下分配 3 只小鼠作为重复试验,共 72 只,分组情况见表 1。给药 24 h 内,统计小鼠死亡情况,计算 LD₅₀ 所在范围,并在该范围内依据 Lorke 法设定 4 个新的氯化镉剂量。

1.2.2 LD₅₀ 测定试验。基于 1.2.1 试验结果,设立 4 个新的氯化镉剂量,每个剂量下随机分配 1 只小鼠。给药 24 h 内,统计小鼠死亡情况,并计算 LD₅₀。

2 结果与分析

2.1 LD₅₀ 剂量范围初步测定

本文根据 Lorke 法进行急性毒性试验,在灌胃 30、100、300 mg/kg 氯化镉的同时,灌胃油酸、黄连素、化香树果序等

表 1 组别及处理

药物组	药物剂量 mg·kg ⁻¹	镉的剂量 mg·kg ⁻¹	小鼠数量 只
对照	-	30/100/300	9
V _c	200	30/100/300	9
油酸	100/100	30/100/300	18
化香树果序	100/200	30/100/300	18
黄连素	100/200	30/100/300	18

注:试验过程受到广东海洋大学试验动物伦理委员会的监督和审查,审查号为 SYXK 2014-0053。

潜在镉毒缓解药物。在给药 24 h 内,对小鼠进行观察,并统计死亡情况,结果见表 2。可看出,对照组未给予镉毒缓解药物时,100 mg/kg 镉致死率为 2/3,300 mg/kg 镉致死率为 3/3,给予常规解毒剂 200 mg/kg V_c 则能有效降低 100 mg/kg 镉的致死率。而给予 100、200 mg/kg 化香树果序和黄连素以及 200 mg/kg 油酸,同样也能显著降低 100 mg/kg 镉致死率。镉对小鼠的半致死剂量范围往高剂量偏移。为了进一步证实该结果,在 30~100 mg/kg 及 100~300 mg/kg 范围内各重新选定 4 个剂量进行试验。

表 2 初步试验中各药物组镉致死率情况

药物组	镉致死率		
	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg
对照	0/3	2/3	3/3
200 mg/kg V _c	0/3	1/3	2/3
100 mg/kg 油酸	0/3	2/3	3/3
200 mg/kg 油酸	0/3	1/3	3/3
100 mg/kg 化香树果序	0/3	1/3	2/3
200 mg/kg 化香树果序	0/3	0/3	2/3
100 mg/kg 黄连素	0/3	1/3	2/3
200 mg/kg 黄连素	0/3	1/3	2/3

表 5 二次试验中不同药物组的镉致死率

镉剂量 mg·kg ⁻¹	200 mg/kg V _c		200 mg/kg 油酸		100 mg/kg 化香树果序		200 mg/kg 化香树果序		100 mg/kg 黄连素		200 mg/kg 黄连素	
	死亡率	LD ₅₀ 剂量 mg·kg ⁻¹	死亡率	LD ₅₀ 剂量 mg·kg ⁻¹	死亡率	LD ₅₀ 剂量 mg·kg ⁻¹	死亡率	LD ₅₀ 剂量 mg·kg ⁻¹	死亡率	LD ₅₀ 剂量 mg·kg ⁻¹	死亡率	LD ₅₀ 剂量 mg·kg ⁻¹
220	0/1		0/1		0/1		0/1		0/1		0/1	
240	0/1		0/1		0/1		0/1		0/1		0/1	
260	0/1		0/1		0/1	>260	0/1		0/1		0/1	
280	0/1	>280	0/1		1/1	<280	0/1	>280	0/1	>280	0/1	
300	2/3	<300	1/3	>300	2/3		2/3	<300	2/3	<300	2/3	
320	1/1		1/1	<320	1/1		1/1		1/1		0/1	>320
340	1/1		1/1		1/1		1/1		1/1		1/1	<340
360	1/1		1/1		1/1		1/1		1/1		1/1	
380	1/1		1/1		1/1		1/1		1/1		1/1	

的镉毒缓解药物中,黄连素的缓解效果最优,给予 200 mg/kg 黄连素时,镉半致死剂量上升至 320~340 mg/kg。

3 讨论

相对于霍恩氏法和孙瑞元改良的寇氏法,以 Lorke 法为基础的 LD₅₀ 分析方法能够方便快捷地探索出毒物半致死剂量区间,并且能够较准确地评价各联合用药的减毒效果。在第 1 次试验中,以镉的半致死剂量近似值 100 mg/kg 为中间值^[2],以 1/3 LD₅₀ 近似值 30 mg/kg 和 3 倍 LD₅₀ 300mg/kg 分别为毒性评价低值和高值进行分组,各组 3 只,这与改良的寇氏法的各组剂量按等比级数、各组动物数相等的原则基本相同,不仅确保了第 1 次试验较高的可信度,同时还能初步评价出该药物减毒(LD₅₀<100 mg/kg)或增效(LD₅₀>100 mg/kg)作用。并针对原 Lorke 法探索镉等毒物存在剂量跨度较大,导致半致死剂量精确度较低等问题^[6],细化二次试验所用剂量

2.2 LD₅₀ 测定试验

基于 2.1 的结果,进一步探索在油酸、黄连素、化香树果序等潜在镉毒缓解药物下的镉半致死剂量 LD₅₀。结果如表 3、4、5 所示。可以看出,对照组的镉经口半致死剂量在 140~160 mg/kg 之间。给予常规解毒剂 200 mg/kg V_c,其镉半致死剂量则上升至 280~300 mg/kg。而给予 100 mg/kg 油酸后,镉半致死剂量上升至 260~280 mg/kg;给予 200 mg/kg 油酸后,镉半致死剂量上升至 300~320 mg/kg;给予其他集中镉毒缓解药物,镉半致死剂量均有不同程度的上升。在这几类潜在

表 3 二次试验中对照组镉致死率

镉剂量/mg·kg ⁻¹	死亡率	LD ₅₀ 剂量/mg·kg ⁻¹
120	0/1	
140	0/1	>140
160	1/1	<160
220	1/1	
240	1/1	
260	1/1	
280	1/1	
300	1/1	
320	1/1	

表 4 二次试验中 100 mg/kg 油酸的镉致死率

镉剂量/mg·kg ⁻¹	死亡率	LD ₅₀ 剂量/mg·kg ⁻¹
180	0/1	
220	0/1	
240	0/1	
260	0/1	>260
280	1/1	<280
300	1/3	
320	1/1	
340	1/1	
360	1/1	

数,将原有的单一范围 4 个剂量扩展到 2 个范围 8 个剂量,可精确地反映出各抗镉药物剂量-效应关系。同样考虑到尽可能减少动物使用数量及精确度,每组单一小鼠的分配原则还是能够提供许多重要的有益数据。

在灌胃氯化镉的同时,给予小鼠 100~200 mg/kg 的油酸、化香树果序、黄连素能够不同程度地降低镉的毒性,提高小鼠镉的半致死剂量。相对于由未灌胃任何抗镉药物的对照组,灌胃油酸组小鼠的镉半致死剂量由 140~160 mg/kg 升至 300~320 mg/kg,其原因可能是油酸有效降低了镉的蓄积及镉造成氧化胁迫,降低镉对小鼠的毒性效应^[3]。而降低镉水平也被认为是有效抗镉减毒的重要方法^[4]。灌胃化香树果序与黄连素同样能够降低镉造成的毒性效应,虽然目前尚未有报道证实两者具有抗镉作用,但化香树果序多糖被证实清除

(下转第 210 页)

又免疫现象,临床症状基本相同。每个血清型又包含若干个亚型。根据世界口蹄疫中心公布,口蹄疫亚型已有 80 多个,且不断有新亚型出现。我国主要有 A、O、亚洲 I 型。口蹄疫病毒对外界环境的抵抗力强、耐干燥,在自然条件下,污染的饲料、饲草、皮毛及土壤中病毒在数日甚至数周内仍有感染性,在-50~-70℃条件下可保存数年;高温和直射阳光(紫外线)对其有杀灭作用;其对酸、碱都特别敏感,2%~4%氢氧化钠、3%~5%福尔马林溶液、5%氨水、0.2%~0.5%过氧乙酸或 5%次氯酸钠等都是口蹄疫病毒的良好消毒剂。②感染对象。在自然条件下,口蹄疫病毒可感染多种动物,以偶蹄动物易感性最高。黄牛、奶牛最易感,牦牛、水牛和猪次之,再次为绵羊、山羊、骆驼等。多种野生动物如黄羊、鹿、野牛、野猪、驼羊、野山羊等均可感染。人对本病有易感性,儿童发病严重,成人较轻。③传染源及感染途径。患病及带毒动物是本病最主要的传染源。本病可经消化道、呼吸道以及损伤的皮肤和黏膜感染。口蹄疫病毒可经直接或间接接触传播。空气也是重要的传播媒介。④潜伏期。口蹄疫发病潜伏期为 1~7 d。其流行有一定周期性,约 3 年流行 1 次。⑤主要症状及发病季节。其临床特征是口腔黏膜、四肢下端及乳房等处皮肤形成水泡和烂斑。该病发病季节不明显,四季均可发病。

5.3.2 疫情形势。安徽省有案可查的口蹄疫疫情共 6 次,即 1932—1933 年、1935 年、1964 年、1970 年、1976—1985 年、1990 年。口蹄疫血清型有 A 型和 O 型。由于各级各地高度

(上接第 203 页)

DPPH、超氧自由基、羟基自由基,具备显著的抗氧化能力^[5];而黄连素也被证实能够降低脂质过氧化、蛋白氧化,具有强抗氧化活性^[6]。结合结果及相关报道,证实了基于 Lorke 法评价油酸、化香果树序及黄连素抗镉减毒活性的方法具有一定的应用价值。

4 参考文献

- [1] YUE Shiqiu, WANG Junran, ZOU Jinhua, et al. Cadmium localization and its toxic effects on root tips of barley[J]. *Zemdirbyste-agriculture*, 2016, 103(2): 151-158.
- [2] STAFFORD A D, ALAN S P, PARAMSOTHY J, et al. Soil cadmium and New Zealand dairy farms: impact of whole-farm contaminant variability on environmental management[J]. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 2018, 254: 282-291.
- [3] ZUGRAVU C A, PARVU M, PATRASCU D, et al. Cadmium pollution of some animal origin foods from Brasov and Dambovitza County[J]. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture*, 2008, 65(2): 453-458.
- [4] ZHANG Runxiang, WANG Lisha, ZHAO Jianing, et al. Effects of selenium and cadmium on ion profiles in the brains of chickens[J]. *Biological Trace Element Research*, 2016, 174(1): 1-8.
- [5] RAGHUVANSHI R, CHAUDHARI A, KUMAR G N. Amelioration of cadmium- and mercury-induced liver and kidney damage in rats by genetically engineered probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 producing pyrroloquinoline quinone with oral supplementation of citric acid[J]. *Nutrition*, 2016, 32(11/12): 1285-1294.
- [6] SHI L, CAO H, LUO J, et al. Effects of molybdenum and cadmium on the oxidative damage and kidney apoptosis in Duck[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2017, 145: 24-31.
- [7] 杨自军. 镉的污染及对动物的危害与防治[J]. *中国动物保健*, 2008(5): 55-60.
- [8] 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): 91-94.
- [9] 沈洁, 谢海棠, 孙瑞元. 定量药理学: 一个促进药物开发及转换型研究严谨思考的多学科领域[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2008, 13(5): 481-493.
- [10] DIETRICH L A. A new approach to practical acute toxicity testing[J]. *Archives of Toxicology*, 1983, 54(4): 275-287.
- [11] 王靖雯, 陈泽娜, 高健, 等. 油酸对小鼠急性镉中毒的缓解作用及镉残留的影响[J]. *生物学杂志*, 2018, 8(24): 1-6.
- [12] 刘莉莉, 林岚, 殷霄, 等. 镉毒性研究进展[J]. *中国职业医学*, 2012, 39(5): 445-447.
- [13] WANG Jingwen, ZHANG Yuanyuan, FANG Zhijia, et al. Oleic acid alleviates cadmium-induced oxidative damage in rat by its radicals scavenging activity[J]. *Biological Trace Element Research*, 2018, 18: 1-6.
- [14] 陈美先. 无机型离子交换树脂去除几种中成药中超标铅镉汞砷的研究[D]. 郑州: 河南大学, 2016.
- [15] 陈易彬, 张益, 陈奎. 化香果树序多糖抗氧化性[J]. *食品科技*, 2010, 35(2): 141-143.
- [16] ZHANG Benjian, XU Dan, GUO Yu, et al. Protection by and anti-oxidant mechanism of berberine against rat liver fibrosis induced by multiple hepatotoxic factors[J]. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology*, 2008, 35(3): 303-309.
- [17] HUANG Z, WANG L. Yangtze Dams increasingly threaten the survival of the Chinese sturgeon[J]. *Curr Biol*, 2018, 28(22): 3640-3647.
- [18] 肖慧. 葛洲坝水利枢纽与珍稀鱼类保护的实践[M]. 黄真. 21 世纪长江大型水利工程中的生态与环境保护. 北京: 中国环境科学出版社, 1998: 199-209.
- [19] 刘榴, 石君玲, 尤修玲, 等. 大鲵泛素结合酶 *cgsUBE2L3* 基因克隆及其在免疫应答中的表达分析[J]. *安徽农业科学*, 2017, 45(22): 93-97.

(上接第 206 页)

- [7] 吴剑峰. 中华鲟的过去, 现在和将来[J]. *生物学教学*, 1993(7): 36-38.
- [8] 云文. “活化石”: 中华鲟[J]. *中国钓鱼*, 1995(2): 41.
- [9] 张辉, 危起伟. 命运堪忧的中华鲟[J]. *大自然*, 2016(6): 8-11.
- [10] 常剑波, 曹文宣. 中华鲟物种保护的历史与前景[J]. *水生生物学报*, 1999(6): 712-720.