

菟丝子水提液对大鼠的急性毒性及微核试验

夏卉芳^{1,2}, 李啸红^{1*}

(1. 遵义医学院珠海校区, 广东 珠海 519041; 2. 贵州师范学院, 贵阳 550018)

[摘要] **目的:**探讨菟丝子水提液对SD大鼠的最大给药量的急性毒性与遗传毒性。**方法:**最大给药量法检测菟丝子水提液对SD大鼠的急性毒性。SD孕鼠骨髓微核试验及胚胎肝转移微核试验,设5组:菟丝子水提液高、中、低剂量组(40, 20, 10 g·kg⁻¹)及阴性对照组(NS, 10 mL·kg⁻¹), 阳性对照组[环磷酰胺(CP)40 mg·kg⁻¹], 检测孕鼠骨髓嗜多染红细胞微核率及胚胎肝嗜多染红细胞微核率。**结果:**菟丝子水提液ig对SD大鼠的最大给药量为80 g·kg⁻¹。菟丝子水提液40 g·kg⁻¹可致孕鼠骨髓细胞、胚胎肝细胞嗜多染红细胞微核率升高, 与阴性对照组对比, 有显著性差异($P < 0.01$)。**结论:**菟丝子水提液对SD大鼠ig最大给药量为80 g·kg⁻¹, 属无毒级。菟丝子水提液ig剂量在40 g·kg⁻¹时可诱发孕鼠及胚胎微核率增加, 有潜在遗传毒性; 而在20 g·kg⁻¹以下剂量时无显著遗传毒性。

[关键词] 菟丝子; 骨髓嗜多染红细胞; 胚胎; 微核

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)13-0185-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014130185

Acute Toxicity Test and Micronucleus Test of Water Extract from Cuscutae Semen in Rats

XIA Hui-fang^{1,2}, LI Xiao-hong^{1*}

(1. Zhuhai Campus of Zunyi Medical College, Zhuhai 519041, China;

2. Guizhou Normal College, Guiyang 550018, China)

[Abstract] **Objective:** To study the acute toxicity and inheritance toxicity of water extract of Cuscutae Semen in SD rats. **Method:** The acute toxicity of water extract of Cuscutae Semen in SD rats was detected by maximum tolerated dose method. Micronucleus test of pregnant mice bone marrow cells and fetal mice hepatocytes were carried out; 5 groups were used for bone marrow and fetal hepatic cell, include high, middle and low dosage of water extract of Cuscutae Semen (40, 20, 10 g·kg⁻¹, respectively), negative control group (normal sodium, NS, 10 mL·kg⁻¹) and positive control group, the micronucleus rates of bone marrow and fetal hepatic cell were evaluated by micronucleus tests. **Result:** The maximum dosage of administration of water extract Cuscutae Semen was 80 g·kg⁻¹. Compared with negative control group, the micronucleus rates of bone marrow and fetal hepatic cell were all significantly increased ($P < 0.01$) at a high dose of 40 g·kg⁻¹. **Conclusion:** The maximum tolerance dose of water extract of Cuscutae Semen (80 g·kg⁻¹) in SD rats is belonged to the non-toxic substance. The high dosage of water extract of Cuscutae Semen (40 g·kg⁻¹) has potential genetic toxicity on micronuclear rates of pregnant mice bone marrow cell and fetal mice hepatocytes, but middle and low dosage of it (20, 10 g·kg⁻¹) have no genetic toxicity.

[Key words] Cuscutae Semen; polychromatophil cells; embryo; micronucleus

[收稿日期] 20140104(010)

[基金项目] 贵州省科学技术基金项目(黔科合J字LKZ[2010]38)

[第一作者] 夏卉芳, 硕士, 讲师, 主治医师, 从事中药药理研究, Tel:0851-5816647, E-mail: xiahuifangy@163.com

[通讯作者] *李啸红, 教授, 从事中药的生殖与发育毒理研究, Tel:13697789894, E-mail: xiaohl160@sina.com

菟丝子为旋花科植物菟丝子的干燥成熟种子。药性辛、甘、平,入肝、肾经。菟丝子化学成分研究已经证实菟丝子提取物主要包括黄酮、多糖等多种成分^[1-4]。具有补阳益阴,固精缩尿,安胎、明目止泻等功效。在临床常用于治疗流产、男性不孕、内分泌失调和慢性肝损伤等病症^[5]。随着菟丝子在临床应用广泛,对于菟丝子的临床用药安全性受到重视,尤其是对孕妇及胎儿毒性影响。本文研究菟丝子水提液对SD大鼠的急性毒性和在致畸敏感期ig孕鼠,采用孕鼠骨髓微核试验与胚胎肝转移微核来观察菟丝子是否能引起微核率的改变,评价菟丝子对大鼠的急性毒性和孕期大鼠、胚胎潜在的遗传毒性,以便为菟丝子的临床合理应用提供安全性评价的药理实验依据^[6-8]。

1 材料

1.1 动物 选择SPF级SD大鼠,体重为180~240 g,购自广东省医学实验动物中心,合格证号SCXK(粤)2008-0002。SPF级鼠专用灭菌饲料由广东省医学实验动物中心提供(配制标准符合GB-14924.3-2001标准)。动物饲养环境:温度25~28℃,相对湿度70%~85%,自然通风,光照、黑暗各12 h,自由摄食、饮自来水。

1.2 仪器 CX-41型光学显微镜(Olympus,日本),TGL-16B型离心机(上海安亭科学仪器厂),JA2003N型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司)。

1.3 药品与试剂 菟丝子药材购自安徽淮涛中药饮片科技有限公司,许可证编号(皖)20100146,国家GMP证书编号(皖)K0295,由贵州师范学院朱富寿教授鉴定为旋花科植物菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam的干燥成熟种子,环磷酰胺(CP,江苏恒瑞医药股份有限公司,批号10042921),小牛血清(浙江天杭生物科技有限公司,批号080124)。

2 方法

2.1 菟丝子水提液的制备 称取菟丝子生药400 g,用1 000 mL蒸馏水清洗2次后,加入800 mL蒸馏水浸泡30 min,武火煮沸后文火再煮30 min,纱布过滤留上清,滤渣再加600 mL蒸馏水同样处理1次,过滤后弃残渣,合并2次滤液入90℃水浴箱,最终浓缩至100 mL(质量浓度为生药4 g·mL⁻¹),4℃冷藏备用^[9]。

2.2 菟丝子水提液对SD大鼠的急性毒性测定 选用SPF级SD大鼠40只,体重180~220 g,雌雄各半,随机分为药物组和阴性对照组,每组20只

(雌、雄各10只)。依据前期预实验,药物组以大鼠胃的最大耐受体积10 mL·kg⁻¹、菟丝子水提液最大允许质量浓度4 g·mL⁻¹分2次ig(间隔6 h)1 d,给药总剂量达80 g·kg⁻¹。阴性对照组以10 mL·kg⁻¹ ig 2次生理盐水(NS)(间隔6 h)。首次ig前大鼠禁食不禁水12 h后,ig后连续观察2组实验大鼠2周。实验期间常规饲养大鼠,观察大鼠的一般情况及有无死亡等情况,并分别在1,3,6,9,12,15 d时称重,第15天在麻醉下解剖实验鼠并且观察大鼠的肝、心、脾、肾各主要脏器的有无异常变化^[10-15]。

2.3 菟丝子水提液对SD孕鼠骨髓细胞、胚胎肝细胞嗜多染红细胞微核的测定 选用体重在200~220 g SPF级SD雌性大鼠60只,体重220~240 g的雄性大鼠30只,雌、雄按2:1比例每晚18:00合笼,次日晨6:00查见雌鼠阴栓者定为孕0 d。将50只孕0 d大鼠随机分组为菟丝子水提液40,20,10 g·kg⁻¹剂量组和阴性对照组(NS,10 mL·kg⁻¹)均于孕第6~18天每日ig给药1次(上午9时),共13 d;阳性对照组于孕第17,18天ip CP 40 mg·kg⁻¹,共2 d。各组孕鼠均于孕第18天末次用药2 h后麻醉、取孕鼠骨髓与胚胎肝。

2.4 孕鼠骨髓与胚胎肝细胞微核标本的制备 各组孕鼠麻醉后:①剪开各组孕鼠后肢皮肤分离肌肉后取股骨,剔净股骨表面的肌肉、筋膜,剪去两端,用1 mL小牛血清冲出骨髓细胞后细胞悬液用300目尼龙滤膜过滤、离心制备骨髓细胞悬液,均匀涂片2张,每组10只孕鼠。自然晾干后用无水甲醇固定6 min,涂片干后用10%姬姆萨染液染色15~18 min,自来水小水流冲洗多余的染料,晾干后备用^[15]。②解剖各组孕鼠腹部暴露子宫,分离出胚胎,每只孕鼠随机在左右子宫各取1只胚胎(每组20只胚胎),分别切取约2 mm×2 mm大小的肝组织,放入含有0.7 mL小牛血清1.5 mL的离心管中,用眼科直剪剪碎成细胞悬液,300目尼龙滤膜过滤、离心后细胞悬液涂片染色同①。

2.5 骨髓与胚胎肝嗜多染红细胞及微核的观察 采用双盲法阅片,选择细胞间隙清晰、染色分辨好的细胞观察。嗜多染红细胞与微核的判断标准:油镜下观察骨髓嗜多染红细胞呈灰蓝色,微核多为圆形、边缘完整,嗜色性与主核质一致,呈紫红色或蓝紫色,直径大小是主核的1/10~1/3。每只孕鼠计数1 000个骨髓嗜多染红细胞,每只胚胎计数500个肝嗜多染红细胞,记录微核数;计算出微核率^[17-19]。

2.6 统计学分析 用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析,每组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间以两两比较,以 $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

3 结果

3.1 对 SD 大鼠的急性毒性 菟丝子水提液按最大给药浓度和最大给药体积给药,即每日 ig 2 次(间隔 6 h),总量为 $80 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后,连续观察 2 周。自第 6 天开始出现体重增长比阴性对照组缓慢,两组

体重的增重数值相比有显著性差异($P < 0.05$),此现象一直延续至第 15 天取材。除此外两组大鼠的毛色、活动、饮食、二便均正常,15 d 内各组实验鼠均无一动物死亡。雌、雄鼠之间无差异。药物组与对照组大鼠的活动、一般情况正常,未出现异常表现、中毒体征与死亡。试验结束时解剖 1/2 数量大鼠,肉眼未见脏器出血、坏死、肿大等明显病变。见表 1。

表 1 菟丝子水提液急性毒性实验对 SD 大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

性别	组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	体质量/g					
			给药前	给药后 3 d	给药后 6 d	给药后 9 d	给药后 12 d	给药后 15 d
雌性	对照	-	197.4 ± 8.1	203.9 ± 9.3	207.6 ± 10.0	212.8 ± 9.5	214.9 ± 8.0	218.8 ± 16.5
雄性	对照	-	199.9 ± 16.7	217.3 ± 23.4	228.9 ± 31.4	234.6 ± 28.6	243.5 ± 27.2	246.0 ± 27.2
雌性	菟丝子	80	192.1 ± 11.0	195.1 ± 15.9	201.7 ± 17.2 ¹⁾	195.1 ± 15.8 ¹⁾	201.3 ± 15.5 ¹⁾	211.6 ± 17.7 ¹⁾
雄性	菟丝子	80	197.9 ± 13.7	204.3 ± 14.4	204.9 ± 14.7 ¹⁾	210.8 ± 15.4 ¹⁾	212.1 ± 15.8 ¹⁾	213.1 ± 16.0 ¹⁾

注:与阴性对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2,3 同)。

3.2 对孕鼠骨髓嗜多染红细胞微核率的影响 菟丝子水提液中、低剂量各组孕鼠骨髓嗜多染红细胞微核率,均未超过正常微核率(0.2%)。而菟丝子水提液高剂量组微核率(0.4 ± 0.05)%、阳性对照组(2.99 ± 0.1)%与阴性组比均有显著性差异(均 $P < 0.01$)。见表 2。

表 2 菟丝子水提液对孕鼠骨髓嗜多染红细胞微核率的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	PCE /n	MN /n	MN /%
阴性对照	-	10 000	5	0.05 ± 0.05
环磷酰胺	0.04	10 000	299	2.99 ± 0.10 ²⁾
菟丝子水提液	40	10 000	40	0.40 ± 0.05 ²⁾
	20	10 000	15	0.15 ± 0.05
	10	10 000	18	0.18 ± 0.04

3.3 对胚胎肝嗜多染红细胞微核率的影响 菟丝子水提液中、低剂量组胚胎肝嗜多染红细胞微核率与阴性对照组相比(0.1%)相比,无显著性差异。菟丝子水提液高剂量组诱发的微核率(0.26 ± 0.1)%与阴性组相比有显著性差异($P < 0.01$)。阳性对照组微核率(3.29 ± 0.05)%与各组相比均有显著性差异($P < 0.01$)。见表 3。

4 讨论

4.1 菟丝子水提液对 SD 大鼠的急性毒性 依据试验结果,当菟丝子水提液按 $80 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量经口给药对成年 SD 大鼠体重的增长略有影响,但不致影响其他器官结构与功能的损伤,且每组的雌、雄鼠之

间也无明显差异。急性毒性试验原则规定,半数致死量(LD_{50}) $> 5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的实验物质属于无毒级。表明菟丝子水提液的急性毒性极低。

表 3 菟丝子水提液对大鼠胚胎肝嗜多染细胞微核率的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)

分组	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	PCE /n	MN /n	MN /%
阴性对照	-	10 000	10	0.10 ± 0.00
环磷酰胺	0.04	10 000	329	3.29 ± 0.05 ²⁾
菟丝子水提液	40	10 000	29	0.26 ± 0.10 ²⁾
	20	10 000	9	0.10 ± 0.05
	10	10 000	17	0.17 ± 0.05

4.2 菟丝子水提液对大鼠的遗传毒性 本实验孕鼠骨髓微核率在菟丝子水提液中、低剂量组、阴性对照组均在 0.2% 以内,对大鼠无潜在的遗传毒性。而菟丝子 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组孕鼠骨髓细胞嗜多染红细胞微核率略高于阴性对照组,微核率在 0.4% 左右,与阴性组比较有差异性($P < 0.01$),提示高剂量菟丝子水提液对孕鼠有潜在的遗传毒性,而菟丝子水提液剂量在 20,10 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时则无遗传毒性。说明菟丝子水提液对孕鼠有潜在的遗传毒性。

菟丝子水提液剂量在 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时可诱导 SD 大鼠胚胎肝嗜多染红细胞微核率(0.26 ± 0.1)%,比阴性对照组增加,两者之间具有差异性($P < 0.01$),而菟丝子水提液剂量小于 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,对其微核率无明显增加影响。说明菟丝子水提液具有一定致突变性。

综上所述,本实验中对大鼠急性毒性试验提示,临床应避免长时间内、高剂量口服菟丝子水提液,以防其对人体造成毒性影响。对孕鼠和胎鼠微核试验表明,孕妇在临床应用高剂量菟丝子口服时,对孕妇及其胎儿的发育可能造成毒性影响。

[参考文献]

[1] Kwon Y S. Steroids constituents from cuscuta chinensis [J]. Nat Prod Sci, 2000, 6 (3):135.
[2] 夏卉芳,李啸红. 菟丝子的药理研究进展[J]. 现代医药卫生, 2012, 28 (3):402.
[3] 吴春艳. 菟丝子的现代研究[J]. 中国实用医药, 2009, 14 (4):243.
[4] 吴美娟. 菟丝子对环磷酰胺诱发的MN的抑制作用. 天津中医学院学报, 1999, 18(4):41.
[5] 杨欣,丁彩飞,张永华,等. 菟丝子水提的对人精子顶体和超微结构的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(5):422.
[6] 马爱团,钟秀会,宫新城,等. 安胎中药方剂对奶牛胚胎着床的作用[J]. 中国兽医学报, 2011, 31 (7):1027.
[7] 赵新广,尤昭玲. 妊娠期方药安全性的研究探微[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10 (4):77.
[8] 陈怡,孙慧兰. 固肾安胎中药对小鼠早期胚胎体外发育的影响[J]. 中国中药杂志, 2008, 33 (14):1767.
[9] 谢广妹. 菟丝子水提取物对卵巢过度刺激大鼠细胞因子的影响[J]. 中药药理与临床, 2010, 26

(1):45.
[10] 许小微. 有毒中药的毒性分级探述[J]. 浙江中医杂志, 2006, 41(5):308.
[11] 黄多术,胡波,张玉菁. 过量服食菟丝子致中毒反应1例[J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(5):301.
[12] 费瑞,迟立超,杜建石,等. 草苈蓉多糖的毒性实验研究[J]. 华北师大学报, 2008, 40(2):98.
[13] 谢元璋,孙蓉,张亚囡,等. 养发生发胶囊对小鼠急性毒性实验研究[J]. 中国药物警戒, 2011, 8 (4):208.
[14] 余丽君,佟丽,牡丹. 紫梅消银洗液作用于豚鼠的急毒实验研究[J]. 内蒙古民族大学学报, 2011, 26 (2):201.
[15] 宋俊斋,温得中,李家亿,等. 中药细辛的遗传毒性实验研究[J]. 中国药物警戒, 2010, 7(5):262.
[16] 李啸红,杨柳,姬可平,等. 中药紫草的遗传毒性实验研究[J]. 中国生育健康杂志, 2003, 14(3):167.
[17] 艾霞,董雪婷,王丽洁,等. 连翘叶水提物对小鼠急性毒性和微核试验[J]. 安徽农业科学, 2011, 39 (11):6397.
[18] 曲玲玲,田淑琴,高媛,等. 狼连涂擦剂急性毒性试验及微核试验[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37 (6):192.
[19] 田逸君,张天宝,朱玉平,等. 草苔虫内酯的遗传毒性评价[J]. 癌变·畸变·突变, 2012, 24(4):309.

[责任编辑 聂淑琴]

《中国当代医药》杂志 欢迎投稿 欢迎订阅

《中国当代医药》杂志是国家卫生和计划生育委员会主管,中国保健协会、当代创新(北京)-医药科学研究院主办的医药卫生专业期刊,本刊已被万方数据数字化期刊群、中国核心期刊(遴选)数据库、中国知网、中国学术期刊网络出版总库、中文科技期刊数据库全文收录,系中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊。现为旬刊,国内刊号:CN11-5786/R,国际刊号:ISSN 1674-4721,邮发代号:2-515,定价:每期20元,通过本刊发行部订阅全年36期杂志优惠价为540元。

主要栏目:研究进展、论著、短篇论著、临床研究、药理与毒理、药品鉴定、药物与临床、麻醉与镇痛、医学检验、影像与介入、中医中药、护理研究、工作探讨、医护论坛等50多个栏目。根据全国继续医学教育委员会的《继续医学教育学分授予与管理办法》学分授予标准,在本刊发表的论文可获得国家级继续教育学分。本刊出版周期短,来稿无论录用与否均在短期内告知作者。对省、部级以上部门立项的科研论文以及本刊订户的论文予以优先刊登。本刊订户凭订阅单复印件投稿,同等条件优先录用。欢迎各医药单位、院校、厂家刊登广告。

社址:北京市朝阳区通惠家园惠润园(壹线国际)5-3-602 邮编:100025

投稿热线:010-59679076 59679077 发行热线:010-59679533 传真:010-59679056

投稿信箱:ddy@vip.163.com 网址:www.dangdaiyiyao.com(网站改版中)