

· 毒理 ·

抗氧化中药有效组分复方的急性毒性及致突变性研究

杨鸿¹, 吴彦^{2*}, 刘钊¹, 钟菊迎¹, 高尔宁¹, 王萍娟², 黄东业², 田照福²

(1. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700;

2. 广西中烟工业有限责任公司技术中心, 南宁 530001)

[摘要] **目的:**根据前期中药组分配伍的抗氧化活性研究结果,采用甘草总黄酮、银杏叶提取物、淫羊藿苷、黄芪总苷和麦冬总皂苷组成中药有效组分最优配伍复方,研究该复方的急性毒性和致突变作用,为其进一步应用的安全性提供理论依据。**方法:**应用急性毒性试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验、小鼠骨髓细胞染色体畸变试验和 Ames 试验检测该组分配伍复方的急性毒性和致突变性。**结果:**急性经口毒性试验,雌性、雄性小鼠经口最大耐受量(MTD)均 > 10 g·kg⁻¹,属实际无毒。小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验、小鼠骨髓细胞染色体畸变试验和 Ames 试验结果均为阴性,显示在本实验条件下,该中药组分复方未见有致突变性作用。**结论:**中药组分配伍复方未见有明显的急性毒性和致突变作用,表明该药物安全性良好。

[关键词] 中药有效组分配伍复方; 急性毒性; 微核; 染色体畸变试验; Ames 试验

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0185-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150185

Research on Acute and Mutagenic Toxic Effects of Active Ingredients Assembling of Chinese Herbs for Antioxidant Activity

YANG Hong¹, WU Yan^{2*}, LIU Zhao¹, ZHONG Ju-ying¹, GAO Er-ning¹,

WANG Ping-juan², HUANG Dong-ye², TIAN Zhao-fu²

(1. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China;

2. Technical Center, China Tobacco Guangxi Industrial Co. Ltd, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the acute and mutagenic toxic effects of the active ingredients assembling of Chinese herbs for antioxidant activity. Chinese herbal active ingredient formula was composed of total flavonoids of Glycyrrhiza, ginkgo biloba extract, total flavonoids of epimedium, astragaloside and total saponins in ophiopogonin. **Method:** Acute oral toxicity test, marrow cell micronucleus test polychromatic erythrocyte (PCE), marrow chromosomal aberration test of mice and Ames were tested. **Result:** Mice acute oral maximum tolerated dose (MTD) of the formula was higher than 10 g·kg⁻¹. The micronucleus rates in all doses were not significantly different from the control group. Negative results were seen form chromosome aberration test. No increase in the number of revertant colonies was found in the Ames test with and without S9 activation system. **Conclusion:** The Chinese herbal active ingredient formula has no toxic substance and mutagenicity effects in this study.

[Key words] active ingredients assembling of Chinese herbal; acute toxicity; mutagenicity; micronucleus test; chromosomal aberration test; Ames test

[收稿日期] 20140305(004)

[基金项目] 广西科学研究与技术开发计划课题(桂科攻 11194005)

[第一作者] 杨鸿, 博士, 副研究员, E-mail: leslie18029@163.com

[通讯作者] * 吴彦, 博士, 副研究员, E-mail: wu_yan2003@hotmail.com

吸烟人群常见体征一般表现为虚实夹杂、阳虚血瘀兼脾虚湿盛,以及阴虚血瘀兼脾虚痰阻体质。治则应以阴阳两补,健脾祛痰,活血通络,止咳平喘为要。基于这种认识,笔者选择淫羊藿、麦冬、黄芪、银杏叶、甘草的组分进行配伍研究,该方功效阴阳两补,健脾祛痰,活血通络,止咳平喘,完全针对吸烟人群体征。前期研究结果^[1-3]表明,甘草总黄酮、银杏叶提取物、淫羊藿苷、黄芪总苷、麦冬总皂苷的最佳配伍组成的中药有效组分复方,具有良好的清除卷烟烟气中多环芳烃、亚硝胺、DPPH 自由基、超氧阴离子和羟自由基等多种有害致癌物质的作用,显示出明确的抗氧化活性。

为了明确该复方的安全性,为其进一步实际应用提供安全保障和科学依据,本研究按《食品安全性毒理学评价程序和方法》^[4]要求,通过急性毒性试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验、小鼠骨髓细胞染色体畸变试验和 Ames 试验,对该复方进行了急性毒性和体内、外致突变作用的研究。

1 材料

1.1 受试药品 甘草总黄酮、银杏叶提取物、淫羊藿总黄酮、黄芪总苷均为南京朗泽医药科技有限公司产品;麦冬总皂苷,上海海灿生物科技有限公司产品,用前按照 33:131:1:1.5:1 比例配成相应浓度的混悬液备用。环磷酰胺,天津金世制药有限公司,批号 20110510。秋水仙素,国药集团化学试剂有限公司,批号 20110203。

1.2 菌株及动物 鼠伤寒沙门氏菌 TA97,TA98,TA100,TA102 均来自北京市疾病预防控制中心 Ames 实验室。急性毒性试验:清洁级昆明种小鼠 20 只,雌雄各半,体重 19~22 g;致突变试验:清洁级昆明种小鼠 100 只,雌雄各半,体重 25~30 g。上述动物均购自军事医学科学院实验动物中心,实验动物生产许可证号 SCXK-(军)2007-004。

2 方法

2.1 急性经口毒性试验(最大耐受量法) 先将实验动物检疫 3 d,选健康成年清洁级昆明种小鼠 20 只,雌雄各半,体重 19~22 g。药物剂量设计雌性、雄性均为 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。按 $0.03 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1} \times 3$ 次/24 h 经口灌胃给予。灌胃前动物禁食过夜,自由饮水。灌胃后给予正常饮食,观察 14 d,记录中毒体征及死亡情况。根据文献^[4]中的试验结果评价标准进行判定。

2.2 小鼠骨髓嗜多染红细胞(PCE)微核试验 实验动物检疫 3 d,选健康成年清洁级昆明种小鼠随机

分为 5 组,每组雌雄各半,体重 25~30 g。中药组分共设高、中、低 3 个剂量组,剂量设计分别为 3.30, 1.65, 0.82 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,另设阴性对照及阳性对照组,阳性对照组给予环磷酰胺 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,阴性对照组给予去离子水。采用 30 h 给药法,即 2 次给药时间间隔 24 h,于末次给药后 6 h,常规取胸骨制片、固定、染色。油镜下对每只动物观察 1 000 个 PCE,计算微核细胞率。

2.3 小鼠骨髓细胞染色体畸变试验 药物制备及分组同前。实验动物检疫 3 d,动物分组及给药剂量同 2.2。灌胃给药 2 次,每次间隔 24 h。在末次给药后 24 h 取材。处死动物前 3 h,按 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注入秋水仙素。取两侧股骨中骨髓制片、固定、染色。油镜下对每只动物观察 100 个染色体分散良好、互不重叠、长短收缩适中、两条单体分开、清楚地显示出着丝点位置的中期分裂细胞进行染色体分析,计算染色体畸变率。

2.4 Ames 试验 称药物 0.5 g 高温(121 °C)灭菌 30 min,于生物安全柜中加无菌去离子水至 10 mL。试验前采用等比稀释法配制各剂量组的样品,最终质量浓度分别为 0.08, 0.4, 2.0, 10.0, 50.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。加样量为 100 $\mu\text{L}/\text{皿}$ 。试验按 Ames 提出的方法进行。采用掺入法和点试法,在 2 种方法中均分别加或不加体外活化系统(S9 混合液)对受试物进行测试。共设 5 个剂量组,剂量设计分别为 0.008, 0.04, 0.2, 1.0, 5.0 $\text{mg}/\text{皿}$,另设阴性对照(自发回变)、阳性对照组、阳性物溶剂对照组(按不同菌株加或不加体外活化系统 S9 的要求选择特定阳性物),每个剂量做 3 块平皿,试验重复 1 次。

2.5 统计学方法 试验数据采用 13.0 统计分析软件处理,计数资料采用卡方检验,用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

3 结果

3.1 急性毒性试验[最大耐受量(MTD)法] 在观察期内,给受试药物后实验动物出现呆滞、卧、不动、出汗等体征;24 h 后恢复正常,无死亡,大体解剖未见异常;雌、雄性小鼠经口 MTD 均 $> 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,根据《食品安全性毒理学评价程序和方法》(GB15193-2003)中的试验结果评价标准判定,急性经口毒性试验雌性、雄性小鼠经口 MTD 均 $> 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,属实际无毒。结果见表 1。

3.2 小鼠骨髓 PCE 微核试验 小鼠骨髓 PCE 微核试验结果见表 2。雌性、雄性各剂量组动物微核细胞率均在正常值范围内,阳性对照组微核细胞率明

表1 中药组分配伍复方对小鼠体重、毒性的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

性别	初始体重 /g	终体重 /g	死亡动物 /只	MTD /g·kg ⁻¹
雌	20.0 ± 0.8	29.4 ± 1.4	0	10
雄	21.0 ± 0.8	38.3 ± 1.4	0	10

显高于阴性对照组,经统计分析,差异有极显著性($P < 0.01$),说明受试动物敏感,试验可靠。PCE/NCE在正常范围内。根据文献[4]中小鼠骨髓细胞微核试验标准判定,中药组分配伍复方小鼠骨髓嗜

多染红细胞微核试验结果为阴性。

3.3 小鼠骨髓细胞染色体畸变试验 在受试物作用24 h后,低、中、高3个剂量组的染色体畸变数与阴性对照组的相比,差异无显著性。阳性对照组的畸变数与阴性对照组相比差异有非常显著性($P < 0.01$)。根据文献[4]中哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验结果评价标准判定,中药组分最佳配伍混合剂对小鼠骨髓细胞染色体畸变试验结果为阴性。小鼠骨髓细胞染色体畸变试验结果见表3。

表2 中药组分配伍复方对小鼠骨髓细胞微核的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

性别	组别	剂量/g·kg ⁻¹	PCE/个	微核/个	PCE	PCE/NCE	微核细胞率/%
雌	阴性对照	0	5 × 1 000	1	0.2 ± 0.4	1.0 ± 0.1	0.02
	中药组分	0.82	5 × 1 000	0	0.0 ± 0.0	1.2 ± 0.1	0.00
		1.65	5 × 1 000	3	0.6 ± 0.5	1.2 ± 0.2	0.06
		3.30	5 × 1 000	2	0.4 ± 0.5	1.2 ± 0.3	0.04
环磷酰胺	0.04	5 × 1 000	98	19.6 ± 6.4	0.9 ± 0.1	19.06 ¹⁾	
雄	阴性对照	0	5 × 1 000	0	0.0 ± 0.0	1.1 ± 0.2	0.00
	中药组分	0.82	5 × 1 000	0	0.0 ± 0.0	1.5 ± 0.1	0.00
		1.65	5 × 1 000	3	0.6 ± 0.9	1.4 ± 0.1	0.06
		3.30	5 × 1 000	2	0.4 ± 0.5	1.2 ± 0.2	0.04
环磷酰胺	0.04	5 × 1 000	99	19.8 ± 7.3	0.8 ± 0.1	19.08 ¹⁾	

注:与阴性对照组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表3同)。

表3 中药组分配伍复方对小鼠骨髓细胞染色体的影响($n = 5$)

性别	组别	剂量 /g·kg ⁻¹	分裂像 /个	断裂 /个	易位 /个	环 /个	微小体 /个	断片 /个	粉碎 /个	多倍体 /个	总数 /个	畸变率 /%
雌	阴性对照	0	5 × 100	0	0	0	0	3	0	0	3	0.60
	中药组分	0.82	5 × 100	0	0	0	0	1	0	0	1	0.20
		1.65	5 × 100	1	0	0	0	6	0	0	7	1.40
		3.30	5 × 100	2	0	1	0	6	0	0	9	1.80
环磷酰胺	0.04	5 × 100	15	10	3	1	37	2	0	68	13.60 ¹⁾	
雄	阴性对照	0	5 × 100	0	0	0	0	1	0	0	1	0.20
	中药组分	0.82	5 × 100	0	0	0	0	1	0	0	1	0.20
		1.65	5 × 100	0	0	0	0	4	0	0	4	0.80
		3.30	5 × 100	5	0	0	0	0	0	0	5	1.00
环磷酰胺	0.04	5 × 100	41	1	2	5	14	1	4	68	13.60 ¹⁾	

3.4 Ames 试验 实验结果表明,不同剂量的组分复方,无论加或不加S9活化系统,其回变菌落数与阴性对照组比较,均无高于自发回变菌落数的2倍,而阳性对照组菌落数均高于阴性对照组的2倍以上,说明中药组分最佳配伍复方Ames试验结果为阴性,对鼠伤寒沙门氏突变型菌株无致突变作用。Ames试验结果见表4~6。

4 讨论

近年来中药的毒副作用越来越受到人们的关注,研究显示一些单味中药及其成分如艾叶油^[5]、桑寄生^[6]、细辛^[7]等在动物整体试验或在细胞离体试验中已显示出遗传毒性阳性或可疑阳性,因而在中药及其复方的研究中重视其遗传毒性研究显得尤为必要。

表 4 中药组分配伍复方 Ames 试验(渗入法)(回变菌落数)(一)($\bar{x} \pm s, n=3$)

剂量/mg/皿	试验菌株	TA97	TA98	TA100	TA102
0.008	-S9	128.0 ± 25.0	36.7 ± 6.5	136.7 ± 13.6	308.0 ± 35.4
	+S9	119.3 ± 15.1	37.3 ± 7.0	142.7 ± 3.1	326.0 ± 24.2
0.04	-S9	125.3 ± 19.2	37.3 ± 5.7	131.3 ± 17.9	305.3 ± 37.8
	+S9	126.7 ± 18.0	35.7 ± 6.0	131.3 ± 10.3	322.7 ± 5.8
0.2	-S9	128.0 ± 8.0	35.3 ± 5.5	130.0 ± 11.1	312.7 ± 7.0
	+S9	121.3 ± 19.4	37.3 ± 8.6	130.0 ± 10.4	307.3 ± 23.9
1	-S9	124.7 ± 10.1	32.7 ± 4.6	141.3 ± 19.7	293.3 ± 33.3
	+S9	114.0 ± 12.5	35.3 ± 7.1	129.3 ± 14.0	307.7 ± 21.5
5	-S9	133.3 ± 7.0	35.3 ± 5.0	134.7 ± 16.0	307.3 ± 19.4
	+S9	130.7 ± 16.3	35.7 ± 5.0	130.0 ± 12.5	309.3 ± 20.2
自发回变	-S9	132.7 ± 9.5	35.0 ± 4.0	130.7 ± 15.0	315.3 ± 26.1
	+S9	144.7 ± 15.0	35.7 ± 7.4	130.7 ± 19.0	312.0 ± 17.1
中药组分	-S9	/	/	/	/
溶剂对照	+S9	/	/	/	/
阳性物	-S9	123.0 ± 20.1	36.7 ± 5.5	/	294.0 ± 24.3
溶剂对照	+S9	141.7 ± 10.5	37.3 ± 2.3	126.0 ± 14.0	301.3 ± 11.0
环磷酸胺	-S9	756.7 ± 106.9	853.3 ± 148.4	740.0 ± 112.7	956.7 ± 72.3
	+S9	710.0 ± 43.6	1 423.3 ± 548.8	716.7 ± 134.3	976.7 ± 271.0

注:TA97,TA98,TA102 不加 S9 选用的阳性物为克敌松(50 mg/皿);TA100 不加 S9 选用的阳性物为叠氮纳(1.5 mg/皿);TA97,TA98,TA100 加 S9 选用的阳性物为 2-氨基芴(5 mg/皿);TA102 加 S9 选用的阳性物为 1,8 二羟基蒽醌(50 mg/皿);除 TA100 不加 S9 组外,其他阳性物溶剂对照均为二甲基亚砷;“/”表示没有形成肉眼可见的回复子菌落(表 5,6 同)。

表 5 中药组分配伍复方 Ames 试验(渗入法)(回变菌落数)(二)($\bar{x} \pm s, n=3$)

剂量/mg/皿	试验菌株	TA97	TA98	TA100	TA102
0.008	-S9	129.7 ± 16.6	32.7 ± 3.8	132.0 ± 10.6	288.0 ± 23.1
	+S9	141.3 ± 15.0	35.3 ± 5.0	130.3 ± 10.5	290.0 ± 21.1
0.04	-S9	132.7 ± 9.5	35.3 ± 4.0	134.0 ± 18.3	288.7 ± 27.6
	+S9	125.3 ± 22.1	34.3 ± 4.9	129.3 ± 13.3	294.0 ± 17.1
0.2	-S9	126.7 ± 18.6	36.0 ± 5.0	132.7 ± 15.1	300.0 ± 17.4
	+S9	138.7 ± 20.5	38.3 ± 2.5	131.3 ± 13.0	304.0 ± 25.0
1	-S9	115.3 ± 16.0	34.0 ± 5.2	133.7 ± 16.5	281.3 ± 16.2
	+S9	130.0 ± 23.6	35.3 ± 4.0	126.0 ± 18.3	282.0 ± 12.2
5	-S9	144.7 ± 14.0	38.0 ± 7.2	140.3 ± 16.2	272.7 ± 26.6
	+S9	140.0 ± 12.8	38.7 ± 7.0	149.7 ± 15.6	283.0 ± 23.4
自发回变	-S9	124.7 ± 15.0	36.0 ± 4.6	133.3 ± 16.7	300.7 ± 17.0
	+S9	143.3 ± 12.1	40.0 ± 1.0	139.0 ± 4.6	310.7 ± 23.2
中药组分	-S9	/	/	/	/
溶剂对照	+S9	/	/	/	/
阳性物	-S9	124.3 ± 19.6	37.7 ± 7.0	/	308.0 ± 36.5
溶剂对照	+S9	129.0 ± 8.9	37.7 ± 6.7	128.0 ± 31.7	294.7 ± 25.8
环磷酸胺	-S9	723.3 ± 112.4	930.0 ± 55.7	686.7 ± 85.0	900.0 ± 111.4
	+S9	733.3 ± 50.3	1 373.3 ± 575.0	720.0 ± 75.5	965.3 ± 228.1

表6 中药组分配伍复方 Ames 试验(点试法)

剂量/mg/皿	试验菌株	TA97	TA98	TA100	TA102
0.008	- S9	-	-	-	-
	+ S9	-	-	-	-
0.04	- S9	-	-	-	-
	+ S9	-	-	-	-
0.2	- S9	-	-	-	-
	+ S9	-	-	-	-
1	- S9	-	-	-	-
	+ S9	-	-	-	-
5	- S9	-	-	-	-
	+ S9	-	-	-	-
自发回变	- S9	-	-	-	-
	+ S9	-	-	-	-
受体物	- S9	/	/	/	/
溶剂对照	+ S9	/	/	/	/
阳性物	- S9	-	-	-	-
溶剂对照	+ S9	-	-	-	-
阳性对照	- S9	+	+	+	+
	+ S9	+	+	+	+

微核试验(MNT)是目前最常用的哺乳动物体内遗传毒学短期试验,用于评价染色体受损情况,不仅能检测染色体结构改变,而且能检测染色体数目的异常。染色体畸变分析(CA)是目前检测药物染色体损伤的经典方法,实验结果可靠,可反映多种畸变类型,主要观察药物在中期对染色体数量和结构的影响。

虽然前期研究显示该中药有效组分复方具有良好的清除多种有害致癌物质的作用,但有研究^[8]显示麦冬水煎剂可诱发细胞的目的基因突变并导致染色体损伤,提示它对人体具有潜在的遗传毒性,而方中淫羊藿总黄酮则能明显降低丝裂霉素C诱发的骨髓微核率和染色体畸变率,并有一定的剂量依赖性^[9],提示该方的临床应用的安全性特点并不明确,因此,本研究重点通过急性毒性实验、反应染色体损伤的骨髓细胞微核实验、小鼠染色体畸变实验以及反应基因突变的Ames试验研究,对该组分复方的遗传毒性进行了研究,根据文献[4]中的试验

结果评价标准判定,该中药组分配伍复方在本实验条件下,急性经口毒性试验显示实际无毒;不同剂量复方组对小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率、小鼠染色体畸变数未见明显影响,说明本品在活体内没有致染色体畸变作用。采用鼠伤寒沙门氏突变型菌株TA97,TA98,TA100,TA102进行的回复突变试验结果表明,不同剂量的组分复方,无论加或不加S9活化系统,其回变菌落数与阴性对照组比较,均无高于自发回变菌落数的两倍,说明该复方对鼠伤寒沙门氏突变型菌株无致基因突变作用。结果显示该中药组分配伍复方未见有急性毒性和致突变性作用,较单味药具有一定的遗传毒性减毒功效,显示具有良好的安全性,为该复方的进一步开发利用提供了一定安全性依据。

[参考文献]

- [1] 吴彦,张雨夏,黄泰松,等.复方中药提取物对卷烟烟气诱发损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(14):260.
- [2] 吴彦,杨鸿,黄泰松,等.5种中药组分配伍体外清除多环芳烃和自由基的研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(12):183.
- [3] 吴彦,杨鸿,刘红,等.中药组分清除烟气有害物质及降低细胞毒性的研究[J].中国中药杂志,2011,36(22):3184.
- [4] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会.GB15193.1-21-2003食品安全性毒理学评价程序和方法[S].北京:中国标准出版社,2004.
- [5] 刘茂生,李啸红,兰美兵,等.艾叶油对小鼠的遗传毒理学研究[J].中药药理与临床,2012,28(2):85.
- [6] 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.
- [7] 宋俊斋,李家亿,杨念,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.
- [8] 胡艳平,宋捷,王欣,等.麦冬水煎剂的遗传毒性研究[J].中国中医药信息杂志,2009,16(7):38.
- [9] 陈逸青,刘从云,孙静,等.淫羊藿总黄酮对丝裂霉素致小鼠骨髓细胞突变的保护作用[J].毒理学杂志,2008,22(5):368.

[责任编辑 邹晓翠]