

## 续断水提液对小鼠急性毒性和遗传毒性的影响

刘星, 李啸红\*, 陈阳, 罗琼, 葛晨, 王超, 黎善铭  
(遵义医学院 珠海校区, 广东 珠海 519041)

**[摘要]** **目的:**探讨续断水提液对小鼠的急性毒性和遗传毒性。**方法:**采用最大耐受剂量法评价续断水提液对小鼠的急性毒性,观察小鼠体重及心脏、脾脏、肝脏、肾脏指数的变化;采用微核实验和单细胞凝胶电泳实验评价其遗传毒性,将 40 只小鼠随机分成空白组( $ig$  10 mL·kg<sup>-1</sup>生理盐水),环磷酰胺组(第 4 天开始注射 0.1 g·kg<sup>-1</sup>环磷酰胺),续断水提液高、中、低剂量组( $ig$  32,16,8 g·kg<sup>-1</sup>续断水提液)。各组小鼠给药 5 d 后处死并解剖,取骨髓细胞检测嗜多染红细胞的微核率;取胸腺、肝脏及脾脏细胞检测续断水提液对小鼠 DNA 的损伤。**结果:**续断水提液经口给药小鼠的最大给药量为 80 g·kg<sup>-1</sup>,该剂量对小鼠体重及心脏、脾脏、肝脏、肾脏指数均无显著影响。中、低剂量组小鼠嗜多染红细胞的微核率与空白组比较无显著性差异;但续断高剂量组微核率明显高于空白组( $P < 0.05$ )。高、中、低剂量组胸腺、脾脏、肝脏细胞尾部 DNA 百分率,尾矩略高于空白组,但均无显著性差异。**结论:**续断水提液对小鼠最大给药剂量为 80 g·kg<sup>-1</sup>,属无毒级;中和低剂量续断水煎液对小鼠无遗传毒性作用,高剂量续断水提液可诱发小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率升高,存在潜在的遗传毒性。

**[关键词]** 续断;急性毒性;遗传毒性;微核;单细胞凝胶电泳

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)05-0160-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016050160

### Acute Toxicity and Genotoxicity of Dipsaci Radix Water Extract Liquid in Mice

LIU Xing, LI Xiao-hong\*, CHEN Yang, LUO Qiong, GE Chen, WANG Chao, LI Shan-ming  
(Zhuhai Campus of Zunyi Medical University, Zhuhai 519041, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the acute toxicity and genotoxicity of Dipsaci Radix in mice. **Method:** The acute toxicity of Dipsaci Radix in mice was evaluated by the maximum tolerated dose method, and the changes of body weight, heart, spleen, liver, and kidney indexes were observed. Its genotoxicity was evaluated by micronucleus test and single cell gel electrophoresis test. 40 mice were divided into five groups randomly: blank group (normal saline of 10 mL·kg<sup>-1</sup> by gavage), cyclophosphamide group (0.1 g·kg<sup>-1</sup> cyclophosphamide was injected since the fourth day), and Dipsaci Radix water extract liquid high dose group, middle dose group and low dose group (32, 16 and 8 g·kg<sup>-1</sup> by gavage). 5 days latter, all of the mice were sacrificed and anatomized. The bone marrow cells were taken to detect the micronucleus rate of polychromatic erythrocytes, and the DNA damages of thymus, liver and spleen were detected by single cell gel electrophoresis test. **Result:** The maximum tolerated dose was 80 g·kg<sup>-1</sup> for Dipsaci Radix water extract liquid by oral taking in mice, and such dose had no significant effect on body weight and heart, spleen, liver, and kidney indexes. Compared with blank group, there was no significant difference in micronucleus rate of polychromatic erythrocytes in middle and low dose groups, but the micronucleus rate of polychromatic erythrocytes in high dose group was significantly higher than that in blank group ( $P < 0.05$ ). The tail DNA percent and tail moment of thymus, liver and spleen in high, middle and low dose groups were a little higher than those in blank group, but with no

**[收稿日期]** 20150827(007)

**[基金项目]** 贵州省中医药管理局科研项目(QZYY2013-98)

**[第一作者]** 刘星, 硕士, 实验师, 从事中药遗传与生殖毒理研究, Tel:13726242487, E-mail:liuxingas@126.com

**[通讯作者]** \*李啸红, 教授, 从事中药遗传与生殖毒理研究, Tel:13697789894, E-mail:xiaoh1160@sina.com

significant difference. **Conclusion:** The maximum tolerated dose of Dipsaci Radix water extract liquid is  $80 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  in mice, with no acute toxicity on mice. Middle and low doses of Dipsaci Radix water extract liquid have no genotoxicity on mice, while high dose of Dipsaci Radix has increased the micronucleus rate of polychromatic erythrocytes, showing potential genotoxicity on mice.

[**Key words**] Dipsaci Radix; acute toxicity; genotoxicity; micronucleus; single cell gel electrophoresis

续断又名川断、川续断,是川续断科川续断属植物川续断的干燥根,因其能使断裂的筋骨接续而得名,始载于《神农本草经》,被列为上品<sup>[1]</sup>。主要含有三萜皂苷类、环稀醚萜类、生物碱、挥发油及其他生物活性成分,其中三萜皂苷类为续断主要的药效成分<sup>[2-3]</sup>。现代药理研究结果显示,续断具有补肝肾,强筋骨,续折伤,止崩漏,安胎等功效。临床上主要用于腰背酸痛,肢节痠痹,跌打损伤,损筋折骨,风湿痹痛,胎动漏红,血崩下血,以及遗精,带下,痈疽疮肿等,是常用补肾安胎药之一<sup>[4]</sup>。目前对续断的化学成分、药理作用、临床应用的研究较深入,但对续断的安全性研究仍显不足。有研究显示,高剂量续断提取液( $32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )具有潜在的胚胎发育毒性作用,对母体和胚胎的生长发育均具有一定影响,在临床用药时应避免高剂量或长期服用<sup>[5-6]</sup>。为了保证续断的临床用药安全,特别是妊娠期妇女用药,有必要进一步系统全面的对其安全性进行评价,尤其是续断遗传毒性的研究。本研究采用最大耐受剂量法研究续断的急性毒性。并利用经典的微核实验(MCN)和单细胞凝胶电泳(SCGE)检测技术,从细胞和分子水平上探讨续断水煎液对小鼠染色体和DNA的损伤,以评价续断的遗传毒性,为续断的临床合理应用提供安全性评价依据。

## 1 材料

**1.1 实验动物** 选用 SPF 级昆明种小鼠,雌雄各半,体重( $20 \pm 2$ ) g,由广东省医学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2013-0002。动物饲料购自广东省医学实验动物中心,合格证号 SCXK(粤)2013-0002。小鼠饲养环境为温度  $25 \sim 28 \text{ }^\circ\text{C}$ ,相对湿度  $70\% \sim 85\%$ ,自然通风,光照/黑暗各 12 h,自由摄食,饮水。

**1.2 仪器** JY600C 型电泳仪,电泳槽均购自北京君意东方电泳设备有限公司;IX73 型荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司)。

**1.3 药品与试剂** 续断(广东省药材公司中药饮片厂,批号 82014111),由遵义医学院珠海校区生药学博士陈阳副教授鉴定为续断科川续断 *Dipsacus asper* 的干燥根;环磷酰胺(CP,江苏恒瑞医药股份有

限公司,批号 13102921)。

## 2 方法

**2.1 续断水提液制备** 称取续断生药 200 g,用蒸馏水清洗数次,加双蒸水 800 mL 浸泡 30 min,武火煮沸,文火再煮 30 min,纱布过滤,滤渣加双蒸水 400 mL 煮沸 30 min 后过滤,合并 2 次滤液,于  $80 \sim 90 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴浓缩至 100 mL,制成浓度 200% (相当于含生药  $2.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),冷藏备用。

**2.2 急性毒性测定** 参照文献[7],采用最大耐受剂量法,SPF 级昆明种小鼠 40 只,随机分为空白组、续断组,每组 20 只(雌雄各 10 只),实验前禁食不禁水 16 h。根据预试验结果,续断组以续断水提液按最大允许质量浓度( $2.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )和小鼠最大耐受体积( $20.0 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ )分 2 次 *ig*,间隔 6 h,给药总剂量达  $80 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。空白组 *ig* 等体积蒸馏水。给药后连续观察 14 d,记录小鼠日常活动、饮食、毛发色泽,二便,生存情况及有无死亡等。于第 7,15 d 对小鼠称重,并于第 15 d 颈椎脱臼法处死小鼠,解剖取心脏、肝脏、脾脏、肾脏,并肉眼观察各脏器是否有异常,分别称重各脏器湿重,并计算脏器指数,以脏器湿质量(mg)/体重(g)表示各脏器指数。

### 2.3 小鼠嗜多染红细胞微核率测定

**2.3.1 分组及给药** SPF 级昆明种小鼠 40 只,随机分成 5 组,每组 8 只。即空白组,环磷酰胺组,高、中、低剂量续断用药组( $32, 16, 8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,分别相当于临床用药剂量的 18, 9, 4.5 倍)。用药组 *ig* 续断水煎液,空白组和环磷酰胺组 *ig* 等量生理盐水,每天 1 次,连续 5 d。环磷酰胺组于第 4 d 开始注射环磷酰胺( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),30 h 内给药 2 次,间隔 24 h。末次给药 6 h 后颈椎脱臼法处死各组小鼠。

**2.3.2 嗜多染红细胞微核实验方法** 参照文献[8],取两侧股骨,剥去肌肉等组织,剪去两端骨髓暴露骨髓腔。取 1 mL 小牛血清将骨髓细胞冲洗到离心管中,300 目尼龙滤膜过滤后吸取少量细胞悬液制涂片,室温晾干。甲醇固定 10 min 后晾干,姬姆萨染色 10 min,冲洗晾干。镜检计数,先在低倍镜下选择细胞着色适当,分布均匀的区域,再在油镜下按顺序进行观察计数。

标准嗜多染红细胞及微核的判断,小鼠骨髓嗜多染红细胞和成熟的红细胞经姬姆萨染色后,在油镜下分别呈灰蓝色和粉红色。微核多为单个,边缘整洁光滑,圆形,呈蓝紫色或紫红色,直径为主核的 1/3。小鼠骨髓细胞滴片按 500 个/只骨髓嗜多染红细胞计数。微核率是指嗜多染红细胞含有微核的数,以千分率(‰)表示<sup>[9]</sup>。

### 2.4 小鼠胸腺、肝脏、脾脏细胞 DNA 测定

**2.4.1 细胞悬液制备** 动物分组及给药同微核实验,颈椎脱臼法处死小鼠,解剖后取出胸腺、肝脏、脾脏,分别放在盛有生理盐水的培养皿中清洗掉表面的血渍,再加入 1 mL 的生理盐水,用眼科剪分别将胸腺、肝脏、脾脏剪碎制成细胞悬液,用 300 目尼龙滤膜过滤于离心管中,1 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,弃上清,用磷酸盐缓冲液(PBS)重悬,调节细胞浓度至 10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup> 个/mL。在光镜下用台盼蓝法检测细胞存活率,存活率在 95% 以上的细胞悬液置 4 ℃ 冰箱中保存备用。

**2.4.2 制片及细胞裂解** 参照文献[10],稍加改良。取用光面载玻片,乙醇中浸泡过夜后,取出自然晾干。取 0.75% 低熔点琼脂糖和细胞悬液混匀(体积比 5:3)80 μL 滴加在载玻片上,立即盖上洁净盖玻片,置于 4 ℃ 冰箱中固化 15 min。取出载玻片,剥掉盖玻片后放入预冷 >1 h 的新鲜配制的裂解液中,4 ℃ 冰箱中避光裂解 >2 h。裂解结束后用 PBS 洗去残留在载玻片上的高浓度盐。

**2.4.3 DNA 解旋及电泳** 将载玻片置于水平电泳槽的阳极端,加入电泳液避光解旋 20 min。待 DNA 充分解旋后将电压调至 14 V,电流 100 mA,避光电泳 20 min。

**2.4.4 染色及结果分析** 电泳结束 PBS 清洗后,滴加 2 mg·L<sup>-1</sup> 的溴化乙锭染色 2 min,迅速用蒸馏水清洗,24 h 内置荧光显微镜下,每只小鼠随机观察 50 个细胞拍照,采用单细胞凝胶电泳分析(CASP)软件对彗星图片进行分析,选用国际公认的尾部 DNA 百分率(tailDNA%),尾矩(tailmoment)作为分析指标。tailDNA% 为单一的彗尾强度指标,尾矩为复合指标,即彗尾 DNA 百分率和彗尾长度的乘积。

**2.5 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件,组间进行 *t* 检验和单因素方差分析,计量结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 续断水提液对小鼠的急性毒性** 续断水提液按最大给药量(80 g·kg<sup>-1</sup>) *ig* 6 h 内,小鼠除因 *ig* 引起的不适之外未发现其他异常情况,二便呈黑色,与药物颜色一致,之后恢复正常。饲养期间小鼠均活泼好动,反应灵敏,毛色光亮,饮水进食等均正常,无小鼠死亡,未观察到明显的中毒症状和体征。处死小鼠解剖后肉眼观察发现各组小鼠的心、肝、脾、肾色泽艳丽,质地鲜嫩,外观无异常变化。续断组和空白组小鼠在初始 7 d 体重增长较后 7 d 增长快。说明小鼠 *ig* 80 g·kg<sup>-1</sup> 续断水煎液未引起明显的毒效应。见表 1。

表 1 续断水提液对小鼠的急性毒性 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Acute toxicity of Dipsaci Radix water extract liquid in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	性别	体重/g			心脏指数	脾脏指数	肾脏指数	肝脏指数
		初始	第 7 d	第 15 d				
空白	雌	20.03 ± 0.70	28.39 ± 1.69	31.30 ± 1.04	6.53 ± 0.78	4.29 ± 0.97	11.13 ± 0.54	48.61 ± 7.36
	雄	20.35 ± 1.74	32.18 ± 1.48	35.55 ± 1.53	6.23 ± 0.54	3.51 ± 0.51	14.74 ± 1.88	54.97 ± 5.91
续断	雌	20.01 ± 1.65	26.81 ± 1.46	29.87 ± 1.49	6.56 ± 0.87	4.87 ± 0.34	13.38 ± 0.43	50.06 ± 2.30
	雄	20.04 ± 1.53	31.13 ± 1.95	35.28 ± 1.81	7.07 ± 2.32	3.84 ± 0.25	17.35 ± 0.37	58.28 ± 8.03

**3.2 续断水煎液对小鼠嗜多染红细胞微核率的影响** 环磷酰胺组小鼠嗜多染红细胞微核率明显高于空白组(*P* < 0.05),说明建模成功,环磷酰胺对嗜多染红细胞中染色体有损伤作用。高、中、低剂量组微核率均明显低于环磷酰胺组(*P* < 0.05);续断中、低剂量组微核率与空白组比较无显著性差异,说明中、低剂量续断水煎液对嗜多染红细胞染色体无损伤作用,未体现出遗传毒性。但续断高剂量组微核率明显高于空白组(*P* < 0.05),说明高剂量续断对小鼠

嗜多染红细胞中染色体有较为明显的损伤。见表 2。

**3.3 续断水煎液对小鼠细胞尾部 DNA 百分率和尾矩的影响** 环磷酰胺组胸腺、肝脏和脾脏细胞尾部 DNA 百分率和尾矩明显高于空白组(*P* < 0.05)。说明环磷酰胺对小鼠胸腺、肝脏和脾脏细胞 DNA 有一定损伤,对小鼠有较为明显的遗传毒性。高、中、低剂量组小鼠尾部 DNA 百分率和尾矩均明显低于环磷酰胺组(*P* < 0.05)。与空白组比较,高、中、低剂

表 2 续断水煎液对小鼠嗜多染红细胞微核率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )  
Table 2 Effect of *Dipsaci Radix* water extract liquid on micronucleus rate of polychromatic erythrocytes ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

分组	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	微核数 /个	微核率 /‰
空白	-	17	4.25 ± 1.88
环磷酰胺	0.1	90	22.50 ± 4.73 <sup>2)</sup>
续断	32	51	12.75 ± 2.94 <sup>1,3)</sup>
	16	37	9.25 ± 2.61 <sup>4)</sup>
	8	38	9.50 ± 2.57 <sup>4)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与环磷酰胺组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。嗜多染红细胞数均为4 000个。

表 3 续断水煎液对小鼠尾部 DNA 百分率和尾矩的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )  
Table 3 Effect of *Dipsaci radix* water extract liquid on tail DNA % and tail moment in mice ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	尾部 DNA 百分率/%			尾矩/μm		
		胸腺	肝脏	脾脏	胸腺	肝脏	脾脏
空白	-	2.85 ± 0.82	15.47 ± 1.15	2.27 ± 1.17	3.35 ± 0.19	16.67 ± 1.69	2.45 ± 0.17
环磷酰胺	0.1	21.22 ± 1.86 <sup>1)</sup>	38.73 ± 3.23 <sup>1)</sup>	11.42 ± 1.13 <sup>1)</sup>	31.64 ± 1.78 <sup>1)</sup>	42.35 ± 3.75 <sup>1)</sup>	9.95 ± 1.03 <sup>1)</sup>
续断	32	3.22 ± 0.73 <sup>1)</sup>	17.21 ± 1.13 <sup>1)</sup>	2.78 ± 1.13 <sup>1)</sup>	3.98 ± 1.12 <sup>1)</sup>	18.07 ± 1.63 <sup>1)</sup>	2.92 ± 0.28 <sup>1)</sup>
	16	3.17 ± 0.82 <sup>2)</sup>	16.95 ± 1.09 <sup>2)</sup>	2.61 ± 1.11 <sup>2)</sup>	3.87 ± 0.19 <sup>2)</sup>	17.78 ± 1.41 <sup>2)</sup>	2.74 ± 0.18 <sup>2)</sup>
	8	2.94 ± 0.92 <sup>2)</sup>	16.53 ± 1.12 <sup>2)</sup>	2.42 ± 1.12 <sup>2)</sup>	3.79 ± 0.17 <sup>2)</sup>	17.30 ± 1.59 <sup>2)</sup>	2.28 ± 0.16 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ,与环磷酰胺组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

出现头背部瘀血的情况<sup>[6]</sup>。因此高剂量的续断水煎液对胚胎发育具有潜在的胚胎发育毒性作用,在临床上应避免长期或者大剂量服用。基于此,本课题组进一步探讨续断水煎液对小鼠的急性毒性和遗传毒性,以研究续断是否具有毒性,是否对细胞内染色体和 DNA 有损伤作用,为续断的临床安全应用提供更为可靠的实验依据。

急性毒性实验一般是指在 24 h 内单次或多次大剂量给予某药物时所出现的有害作用,通过急性毒性实验可初步了解药物对机体的毒效应<sup>[11]</sup>。体重是反映机体发育是否正常的主要标志,而脏器指数是反映实验动物器官功能是否正常的重要指标,通过受试物对脏器的影响可初步判断其毒性及主要的靶器官<sup>[12]</sup>。本研究结果提示,续断水煎液以 80 g·kg<sup>-1</sup> 经口给药未造成小鼠死亡和不适,无法测出半数致死剂量(LD<sub>50</sub>)。根据 GB15193-2003 中的急性毒性剂量分级,LD<sub>50</sub> > 21.5 g·kg<sup>-1</sup> 的受试物属于无毒级<sup>[13]</sup>。该剂量续断水煎液可降低小鼠第 7, 15 d 的体重,可使小鼠的心脏、脾脏、肝脏、肾脏指数升高,但均未能造成显著性的影响,表明续断属无毒级,但有可能引起体重降低,并使各脏器发生轻微肿大。

量组小鼠胸腺,肝脏和脾脏细胞尾部 DNA 百分率和尾矩均略高于空白组,但无显著性差异。说明各剂量续断水煎液对小鼠胸腺,肝脏,脾脏细胞 DNA 均无明显损伤,对小鼠无明显的遗传毒性。见表 3。

#### 4 讨论

续断作为常用保胎中药,在妊娠期妇女中广泛用药,对其安全性进行评价尤为重要。有研究表明续断提取液高剂量(32 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)可降低母体体重,并引起胚胎骨骼发育异常,而导致流产或胚胎死亡<sup>[5]</sup>。另有研究表明高剂量续断水煎液(28 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)虽未见明显的致畸作用,但胎仔鼠

遗传毒性是指环境中的理化因素作用于有机体,使其遗传物质在染色体水平,分子水平和碱基水平上受到各种损伤而诱发突变,出现细胞衰老,肿瘤,出生缺陷(流产、死胎、先天性疾病)等<sup>[14]</sup>。遗传毒性的研究是药物非临床安全性评价的重要内容,它与其他毒理学研究尤其是致癌性研究,生殖毒性研究有密切联系。随着人们对生殖健康的高度关注,遗传毒性的研究日益受到重视,研究范围越来越广,包括重金属、食品添加剂、环境污染源、工业纳米材料、保健食品、日常饮品、药品、中药、天然植物提取物等<sup>[15-23]</sup>。

SCGE 是一项新的有核细胞 DNA 损伤的检测方法,可在单个细胞水平上检测 DNA 的损伤,还能间接反映 DNA 损伤的修复情况。因损伤的细胞电泳后形态颇似彗星,因此又称彗星电泳<sup>[24-25]</sup>。具有检测快速,灵敏度高,操作简便,所需样品量少,无需放射性标记等优点,目前广泛应用于遗传毒理、环境监测、临床、饮食及氧化应激和细胞凋亡等医学研究中。随着 SCGE 技术的发展和不断成熟,在中药抗衰老抗氧化,抗突变抗癌变和遗传毒性等方面应用越来越广泛,也是其作用机制研究的重要手段之一<sup>[26]</sup>。

MCN 是一种能够快速检测化学毒物引起染色体损伤和干扰细胞有丝分裂的技术,常用来检测染色体断裂剂和非整倍体诱导剂对染色体的损伤作用,是进行体内遗传毒性实验的经典和首选方法,目前广泛用于对药物的潜在遗传毒性的评价<sup>[27]</sup>。特别是应用小鼠骨髓嗜多染红细胞微核检测方法,现已成为一种能获得大量客观数据的药物遗传毒性评价体系。

遗传毒性研究中,环磷酰胺对小鼠骨髓嗜多染红细胞染色体有明显损伤,可使微核率升高。同时环磷酰胺可导致胸腺、肝脏和脾脏细胞 DNA 损伤,形成明显彗尾,尾部 DNA 百分率和尾矩较空白组有明显提高,这与其他研究结果一致<sup>[28-30]</sup>,环磷酰胺可损害胸腺、肝脏和脾脏组织。

本研究低、中剂量续断水煎液对嗜多染红细胞微核率,及胸腺、肝脏和脾脏细胞中 DNA 均无明显损伤。但高剂量续断水煎液(32 g·kg<sup>-1</sup>)可使骨髓细胞中的嗜多染红细胞的微核率明显升高,说明该剂量续断水煎液引起了嗜多染红细胞中染色体断裂,具有明显遗传毒性。而 SCGE 实验显示该剂量并未引起胸腺、肝脏、脾脏细胞中 DNA 发生损伤,未体现出明显的遗传毒性。对此笔者认为高剂量续断水煎液对造血器官的影响较成熟组织的影响更为敏感,尤其对造血干细胞具有较明显的损伤。嗜多染红细胞是分裂后期的红细胞由幼年发展为成熟红细胞的一个阶段,细胞分裂旺盛,其染色体活动频繁。因此药物更易渗透到细胞核中,引起染色体结构发生变化,最终导致染色体发生断裂形成微核,但其具体影响机制有待进一步深入研究。

综上所述,续断属无毒级。低、中剂量续断水煎液对小鼠无遗传毒性,但高剂量(32 g·kg<sup>-1</sup>)续断水煎液可诱发嗜多染红细胞微核率升高,存在潜在的遗传毒性,还需通过其他遗传毒性检测方法如果蝇伴性隐性致死实验,鼠伤寒沙门氏菌回复突变实验,体外哺乳动物染色体畸变实验,精子畸形实验等进一步验证该剂量的续断水煎液是否具有遗传毒性,以确保续断的临床安全用药。在本研究采用的遗传毒性实验方法中,当用药剂量达到临床用药剂量 18 倍时会损伤嗜多染红细胞中的染色体,使其发生断裂。因此在临床用药时应避免大剂量或长期服用续断,以防对母体或胎儿的生长发育不利。本研究中采用的受试物为续断水煎液,包含了续断中所有有效成分,而具体是哪种活性成分造成染色体损伤也有待进一步分离后进行检测。且有必要对续断的

亚急性毒性和长期慢毒性进行研究,以更全面确保续断临床用药安全,为续断的综合开发利用提供可靠的毒理学依据。

#### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:化学工业出版社,2005:329-330.
- [2] Zhao B T, Jeong S Y, Moon D C, et al. Quantitative determination and pattern recognition analyses of bioactive marker compounds from *Dipsaci Radix* by HPLC[J]. Arch Pharm Res, 2013, 36(11):1345-1353.
- [3] 陶益,季德,蔡宝昌,等. 续断炮制工艺和炮制机制的研究进展[J]. 中国药房, 2014, 25(39):3735-3738.
- [4] 丁莉,李慧,武艺,等. 药材川续断的研究进展[J]. 湖北民族学院学报:自然科学版, 2010, 28(3):320-324.
- [5] Xiao T T, Xu M, Yang X H, et al. The evaluation of embryotoxicity of *Dipsaci Radix* with mice and embryonic stem cells[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(1):114-122.
- [6] 钟美英. 续断水煎液对 SD 孕鼠致畸感期母体及胚胎影响的实验研究[D]. 长沙:湖南中医药大学, 2008.
- [7] 张宏. 罗汉果的遗传毒性与胚胎发育毒性实验研究[D]. 贵州:遵义医学院, 2011.
- [8] 夏卉芳,李啸红. 菟丝子水提液对大鼠的急性毒性及微核试验[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(13):185-188.
- [9] Furtado M A, De Almeida L C, Furtado R A, et al. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay[J]. Mutat Res, 2008, 657(2):150-154.
- [10] 陈晓白,王晓平,黄小婷. 应用单细胞凝胶电泳技术评价牛大力的遗传毒性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12):222-225.
- [11] 周立国. 药物毒理学[M]. 北京:中国医药出版社, 2003:146-162.
- [12] 孙相和,宁红梅,李冲,等. 醋酸铅对小鼠的急性毒性效应[J]. 西北农林科技大学学报, 2014, 42(9):11-16.
- [13] 卫生部国家标准化委员会. GB15193-2003 食品安全性毒理学评价和方法[S]. 北京:中国标准出版社, 2004:17-58.
- [14] 兰美兵,余永莉,卢巍,等. 甘肃产艾叶挥发油的化学成分及遗传毒性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13):252-255.
- [15] 梁婧,罗环. 铅及其化合物遗传毒性的研究进展[J]. 职业与健康, 2013, 29(14):1806-1807.
- [16] 白彩慧,王文娟,李明,等. 2 种膨松剂对小鼠遗传毒性的比较研究[J]. 食品科技, 2014, 39(1):309-312.

- [17] 黄超培,何励,王彦武,等. 苦丁茶的急性毒性和遗传毒性研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(2): 183-184.
- [18] Traversi D, Cervella P, Gilli G. Evaluating the genotoxicity of urban PM2.5 using PCR-based methods in human lung cells and the Salmonella TA98 reverse test [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2015, 22(2): 1279-1289.
- [19] 李庆,黄俊明,杨颖,等. 沉香叶的急性毒性和遗传毒性研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(10): 1518-1521.
- [20] 钱星文,刘凡,彭菊,等. 当归双参蛤蟆油片的遗传毒性实验研究[J]. 光明中医, 2015, 30(3): 499-500.
- [21] 莫叶勤,冯洁,蒙志斌,等. 毛郁金醇提物的急性毒性和遗传毒性研究[J]. 毒理学杂志, 2015, 29(3): 238-241.
- [22] 孙晓霞,张莉华,许新德,等. 内消旋玉米黄素的遗传毒性研究[J]. 中国食品添加剂, 2015(6): 104-108.
- [23] 吴友苹,张升. 桑叶水提液的急性毒性和遗传毒性研究[J]. 中成药, 2015, 37(4): 876-879.
- [24] 张建军,姜凌,柴振海. 体内彗星试验在药物遗传毒性评价中的研究方法[J]. 药物评价研究, 2014, 37(3): 272-275.
- [25] Collins A R. Measuring oxidated damage to DNA and its repair with the comet assay [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(2): 794-800.
- [26] 张春红,林欣大. 单细胞凝胶电泳检测DNA损伤的最新研究进展[J]. 核农学报, 2011, 25(6): 1230-1234.
- [27] 曹佳. 微核试验原理、方法及其在人群监测和毒性评价中的应用[M]. 北京:军事医学科学出版社, 2000: 1-25.
- [28] 姜荣燕,朱立平,陈述英,等. 加味六味地黄汤对环磷酰胺致幼年大鼠肝损害的保护作用[J]. 中国中西医结合儿科学, 2009, 1(5): 445-447.
- [29] 宋利斌,毛飞寅,王泽时. 加味四君子汤对环磷酰胺致免疫低下小鼠的免疫调节研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2012, 36(10): 1112-1116.
- [30] 包汇慧,耿雪,贾旭东,等. 环磷酰胺对大鼠脾细胞抑制作用的研究[J]. 毒理学杂志, 2014, 28(3): 189-194.

[责任编辑 张丰丰]

## 《中国实验方剂学杂志》入选“2015—2016 RCCSE 中国核心学术期刊”

由武汉大学中国科学评价研究中心(RCCSE)、武汉大学图书馆、中国科教评价网(www.nseac.com)共同研制的第4版《RCCSE 中国学术期刊评价研究报告——权威、核心学术期刊排行榜(2015—2016)》已于2015年1月13日公布,《中国实验方剂学杂志》被评定为“RCCSE 中国核心学术期刊(A)”,在参评的112本中医学与中药学类期刊中综合排名第15名。

本次学术期刊评价在重点突出期刊学术影响力的同时,也注重了对期刊网络传播效率和期刊即时反应速率的考察,主要评价指标有:总被引频次、2年影响因子、即年指标、基金论文比、Web即年下载率、二次文献转载量(或国外重要数据库收录情况)和专家定性评价。参评期刊共6201种,排名前5%的“RCCSE 中国权威学术期刊”(A<sup>+</sup>)316种,排名前5%~20%的“RCCSE 中国核心学术期刊”(A)和排名前20%~30%的“RCCSE 中国核心学术期刊(扩展版)”(A<sup>-</sup>)共1572种,准核心的学术期刊1848种(B<sup>+</sup>),一般期刊1828(B)种,较差期刊637种(C)。

“RCCSE 中国核心学术期刊”是继“中文核心期刊(北大)”和“中国科技核心期刊”之后国内推出的又一核心期刊评价体系。