

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.03.005

银参胶囊遗传毒性研究*

刘玉明, 蒋定文, 李珂娴, 陈伟, 侯登勇[△]

(中国人民解放军海军特色医学中心, 上海 200433)

摘要:目的 探讨银参胶囊的遗传毒性。方法 选用 SPF 级健康 ICR 小鼠, 通过 Ames 试验、小鼠骨髓细胞微核试验、小鼠睾丸染色体畸变试验等遗传毒性试验验证银参胶囊的安全性。结果 Ames 试验中, 银参胶囊在 8~5 000 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 剂量范围内, 无论是否加入哺乳动物肝脏微粒体酶(S₉), 鼠伤寒沙门菌 TA97, TA98, TA100, TA102 等 4 株菌的回复突变菌落数均未出现剂量依赖性增加; 微核试验中, 2 500, 5 000, 10 000 mg/kg 剂量组未见骨髓中含微核的嗜多染红细胞数增加; 小鼠睾丸染色体畸变试验中, 药物质量分数为 2 500, 5 000, 10 000 mg/kg 时, 细胞的染色体畸变率均未出现剂量依赖性增加。结论 银参胶囊未显示致突变作用, 可初步判定其在遗传毒性方面是安全的。

关键词: 银参胶囊; 遗传毒性; Ames 试验; 小鼠; 骨髓细胞微核试验; 睾丸染色体畸变试验

中图分类号: R932; R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)03-0017-03

Genotoxicity of Yinshen Capsule

LIU Yuming, JIANG Dingwen, LI Kexian, CHEN Wei, HOU Dengyong

(Naval Characteristic Medical Center of PLA, Shanghai, China 200433)

Abstract: Objective To explore the genotoxicity of Yinshen Capsule. **Methods** Healthy mice of specific pathogen free SPF were chosen, and Ames test, bone marrow cell micronucleus test and testicular chromosome aberration test were adopted to verify the safety of Yinshen Capsule. **Results** In Ames tests, no dose-dependent increase was observed in the number of revertant colony of salmonella typhimurium TA97, TA98, TA100 and TA102 in the range of 8-5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ dose of Yinshen Capsule, with or without S₉. In micronucleus tests, in 2 500, 5 000 and 10 000 mg/kg dose group, no increase in the number of polynuclear polyerythrocytes with micronucleus in the bone marrow was observed. In the chromosome aberration tests, no dose-dependent increase was observed in the chromosome aberration rate of cells when the drug concentrations were 2 500, 5 000 and 10 000 mg/kg. **Conclusion** Yinshen Capsule does not show any mutagenic effect, and it can be preliminarily determined that it is safe in genotoxicity.

Key words: Yinshen Capsule; genotoxicity; Ames test; mice; bone marrow cell micronucleus test; testicular chromosome aberration test

银参胶囊具有增强免疫力的作用, 以刺五加提取物、银耳提取物等为主要成分。刺五加又名五加参, 主治腰膝酸软、体虚乏力, 对于提高机体免疫力有重要作用^[1]。银耳为祖国医学著名的滋补药, 具有滋阴润肺、养胃生津等功效, 可提高机体免疫力^[2-3]。目前, 对刺五加、银耳的毒性报道甚少^[4-5], 其遗传毒性研究尚未见报道。本研究中根据《保健食品检验与评价技术规范》, 对银参胶囊的遗传毒性进行研究, 为其临床应用提供参考, 为银参胶囊保健食品申报资料提供试验数据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物、仪器与试药

动物: 健康 ICR 小鼠, 体质量 25.0~29.8 g, 75 只(雌性 25 只, 雄性 50 只)。南京医科大学实验动物中心提供, 清洁级, 合格证号为 SCXK(苏)2008-0004 号, SPF 级实验动物环境设施合格证号为 SYXK(苏)2012-0037。所有动物均给予灭菌鼠饲料和灭菌水, 灭菌水自由取用。

仪器: 37XB 型倒置显微镜(上海光学仪器厂); XDS-1B 型显微镜(重庆光电仪器有限公司); AL204

型电子天平(瑞士 Mettler 公司); LD5-2A 型离心机(北京医用离心机厂); DHG-9140A 型烤箱(上海慧泰仪器制造有限公司); Heracell 150i 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Electron 公司)。

试药: 银参胶囊(上海麦迪普生物有限公司, 批号为 Y12061331); Ames 试验菌株(美国 Moltax 公司); 琼脂粉、氯化钠、Giemsa 染液、磷酸盐缓冲液、葡萄糖、葡萄糖-6-磷酸钠盐、甲醇、伊红染液(中国医药集团上海化学试剂公司); 1,8-二羟蒽醌(Macklin 公司, 批号为 C10062078); 叠氮钠(浙江东阳市凯明特种试剂有限公司, 批号为 200901001); 2-氨基苄(2-AF, J&K Scientific Ltd., 批号为 LP50M40); 环磷酰胺(江苏盛油医药有限公司, 批号为 12766768); 敌克松(AccuStandard, 批号为 4030165-01)。

1.2 方法

1.2.1 Ames 试验

采用平板掺入法。将银参胶囊设 8, 40, 200, 1 000, 5 000 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 5 个浓度, 作为剂量组, 无菌称取 500 mg

*基金项目: 中国人民解放军海军特色医学中心横向合作项目[12F201]。

第一作者: 刘玉明, 男, 博士研究生, 副研究员, 研究方向为核辐射防护及中药现代化, (电子信箱)liuyuming888627@sohu.com。

[△]通信作者: 侯登勇, 男, 博士研究生, 副研究员, 研究方向为生物医药, (电子信箱)houdy2@163.com。

样品,精密称定,加入灭菌纯净水,定容至 10 mL,再用灭菌纯净水连续 5 倍稀释成所需各浓度。设空白对照组和溶剂对照组各 1 个,以及阳性对照组 4 个,其中阳性对照物分别为敌克松(Dexon) 50 μg (-S₀)、叠氮钠(NaN₃)为 1.5 μg (-S₀)、2-AF 为 10 μg (+S₀),1,8-二羟基蒽醌为 50 μg (+S₀)。阳性药分别用蒸馏水和 DMSO 溶解,加药体积均为 0.1 mL。所选菌株为 TA97, TA98, TA100, TA102^[6-7],经基因型鉴定,符合要求后将各菌株过夜培养,细菌浓度均在 10⁹ 个/mL 或以上。S₀ 肝微粒体酶由 Aroclor1254 诱导的大鼠肝匀浆, S₀ 混合液中 S₀ 浓度为 10%。每种菌株每个测试浓度做 3 皿平行,计数每个试验皿生长菌落数,试验共测试 2 次。

1.2.2 小鼠骨髓细胞微核试验

将 50 只 ICR 小鼠(雌雄各半)随机分为 5 组,分别为剂量组 3 个,空白对照组和阳性对照组各 1 个,各 10 只。银参胶囊人体推荐剂量为 1.05 g/d,即推荐剂量为 17.5 mg/kg BW,3 个剂量组分别按人体推荐剂量的 143 倍、286 倍、572 倍进行设计,各剂量组配制方法如下。称取银参胶囊粉末 2 500, 5 000, 10 000 mg,精密称定,加纯净水至 20 mL 配制成受试物,其质量分数依次为低剂量组(2.5 g/kg BW)、中剂量组(5.0 g/kg BW)、高剂量组(10.0 g/kg BW);阳性对照组取环磷酰胺 40 mg 加生理盐水至 20 mL,配制成质量浓度为 2 mg/mL(环磷酰胺 40 mg/kg BW),备用;空白对照组给予蒸馏水。各组均采用 30 h 灌胃法 2 次,每次灌胃容量为 20 mL/kg。第 2 次灌胃后 6 h 取股骨骨髓悬于小牛血清中直接涂片、固定、染色,镜检嗜多染红细胞(PCE)1 000 个/鼠,计数含微核的细胞数,计算细胞微核率。对每只动物观察并记录 200 个 PCE 及所见成熟红细胞(NCE),依此计算 PCE/NCE 比值^[8]。

1.2.3 小鼠睾丸染色体畸变试验

将 25 只 ICR 雄性小鼠随机分为 5 组,剂量组 3 个、空白对照组和阳性对照组各 1 个,各 5 只。3 个剂量组配

制方法同 1.2.2。阳性对照组取环磷酰胺 40 mg 加生理盐水至 10 mL,配制成质量浓度为 4 mg/mL,备用;空白对照组给予蒸馏水。各剂量组和空白对照组均连续灌胃 5 d,每次灌胃容量均为 20 mL/kg,每天 1 次;阳性对照组腹腔注射(环磷酰胺 40 mg/kg BW),连续 5 d,每天 1 次,剂量为 10 mg/kg。各组动物均于处死前 6 h 腹腔注射秋水仙素 4 mg/kg,第 14 天杀鼠取睾丸,拉开曲细精管,低渗、固定、软化、制片、染色、镜检。对每只动物完成 500 个完整精子的镜检,计算畸形率^[9]。

1.3 统计学处理

采用 Excel 软件建立数据库,SPSS 20.0 统计学软件分析。采用 χ^2 检验法和二项分布进行统计与分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ames 试验

结果见表 1。与未处理对照组菌落数相比,阳性对照组有显著差异($P < 0.01$),各试验组均未超过 2 倍以上,样品对标准测试菌 TA97, TA98, TA100, TA102 均未检出明显的诱变活性,结果为阴性,故认为银参胶囊无致突变性。

2.2 骨髓细胞微核试验

结果见表 2。各剂量组的微核率与空白对照组相比,均无显著差异($P > 0.05$),也无剂量-反应关系,阳性对照组微核率与空白对照组相比,有显著差异($P < 0.01$);各剂量组 PCE/NCE 比值均不低于对照组的 20%,显示受试物对红细胞无抑制作用。银参胶囊未显示使小鼠骨髓 PCE 细胞微核率上升的致突变作用,在受试剂量下,未检出银参胶囊样品对雄性小鼠骨髓嗜多染红细胞致微核作用。

2.3 睾丸染色体畸变试验

结果见表 3。样品各剂量组小鼠具染色体畸变的初级精母细胞率较空白对照组均无显著差异($P > 0.05$),也无剂量-反应关系,阳性对照组较空白对照组有显著差异($P < 0.01$)。在受试剂量下,未检出该样品对雄性小鼠睾丸初级精母细胞染色体的诱变活性。

表 1 银参胶囊 Ames 试验结果($\bar{X} \pm s, n = 3$, 第 1 次/第 2 次)

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{皿}$)	TA97		TA98		TA100		TA102	
		-S ₀	+S ₀	-S ₀	+S ₀	-S ₀	+S ₀	-S ₀	+S ₀
空白对照组	0	141 ± 15/121 ± 19	127 ± 17/117 ± 14	31 ± 3/35 ± 5	30 ± 2/31 ± 2	142 ± 15/129 ± 16	129 ± 16/142 ± 15	269 ± 26/255 ± 21	249 ± 24/250 ± 22
溶剂对照组	0	130 ± 13/144 ± 18	112 ± 14/122 ± 15	35 ± 5/42 ± 4	32 ± 2/30 ± 2	146 ± 18/122 ± 14	122 ± 14/145 ± 16	262 ± 21/257 ± 21	255 ± 20/247 ± 25
银参胶囊组	8	136 ± 16/153 ± 12	122 ± 16/116 ± 14	36 ± 3/39 ± 6	31 ± 2/30 ± 4	178 ± 15/132 ± 16	128 ± 16/124 ± 15	258 ± 27/252 ± 27	251 ± 22/248 ± 23
	40	125 ± 13/168 ± 16	121 ± 16/161 ± 15	34 ± 4/36 ± 4	29 ± 3/33 ± 3	164 ± 18/139 ± 17	117 ± 16/119 ± 16	251 ± 23/257 ± 28	245 ± 25/252 ± 22
	200	129 ± 15/162 ± 14	116 ± 16/140 ± 15	37 ± 3/35 ± 5	32 ± 4/33 ± 4	158 ± 17/163 ± 17	120 ± 14/108 ± 15	272 ± 21/264 ± 21	253 ± 20/259 ± 28
	1 000	132 ± 14/137 ± 15	125 ± 13/132 ± 16	36 ± 4/44 ± 3	29 ± 3/34 ± 2	186 ± 18/156 ± 15	128 ± 17/128 ± 17	266 ± 28/251 ± 26	248 ± 20/246 ± 22
	5 000	112 ± 15/113 ± 17	106 ± 14/100 ± 16	33 ± 2/43 ± 3	32 ± 3/37 ± 3	177 ± 17/165 ± 19	119 ± 15/121 ± 16	255 ± 33/258 ± 24	241 ± 28/255 ± 21
阳性对照组		1 232 ± 214*/1 195 ± 185*	1 416 ± 190*/1 329 ± 198*	1 376 ± 153*/1 230 ± 200*	1 208 ± 195*/1 366 ± 211*	1 185 ± 184*/1 080 ± 143*	1 510 ± 211*/1 476 ± 165*	835 ± 64*/799 ± 129*	1 214 ± 179*/1 124 ± 174**

注:a 为 Dexon(50 $\mu\text{g}/\text{皿}$),b 为 NaN₃(1.5 $\mu\text{g}/\text{皿}$),c 为 2-AF(10.0 $\mu\text{g}/\text{皿}$),d 为 1,8-二羟基蒽醌(50 $\mu\text{g}/\text{皿}$);与溶剂对照组比较,* $P < 0.01$ 。

表2 银参胶囊小鼠骨髓细胞微核试验结果($\bar{X} \pm s$, 雌性/雄性, $n = 5$)

组别	剂量(mg/kg)	观察细胞数(个)	含微核细胞数(个)	微核细胞率(%)	PCE/NCE
空白对照组	0	5 000/5 000	7/8	1.4 ± 1.1/1.6 ± 0.9	1.01 ± 0.04/1.01 ± 0.05
剂量组	2 500	5 000/5 000	8/8	1.6 ± 0.5/1.6 ± 1.1	1.02 ± 0.03/1.06 ± 0.06
	5 000	5 000/5 000	7/7	1.4 ± 0.5/1.4 ± 1.1	1.02 ± 0.03/1.02 ± 0.02
	10 000	5 000/5 000	9/10	1.8 ± 0.8/2.0 ± 0.7	0.99 ± 0.01/0.98 ± 0.01
阳性对照组	40	5 000/5 000	110/117	22.0 ± 7.6*/23.4 ± 8.5*	0.97 ± 0.09/0.98 ± 0.09

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$ 。

表3 银参胶囊小鼠睾丸染色体试验结果[个($\bar{X} \pm s, \%$), $n = 5$]

组别	剂量(mg/kg)	性染色体早熟分离	常染色体早熟分离	畸变细胞 ^a
空白对照组	20	16(3.2 ± 1.1)	11(2.2 ± 1.1)	3(0.6 ± 0.5)
剂量组	2 500	17(3.4 ± 1.3)	12(2.4 ± 1.1)	3(0.6 ± 0.9)
	5 000	18(3.6 ± 1.1)	12(2.4 ± 1.1)	1(0.2 ± 0.4)
	10 000	17(3.4 ± 1.1)	13(2.6 ± 0.9)	2(0.4 ± 0.9)
阳性对照组	40	36(7.2 ± 1.3)	29(5.8 ± 1.9)	47(9.4 ± 2.7)*

注:a为断裂、断片、易位、微小体等;与空白对照组比较,* $P < 0.01$ 。

3 讨论

遗传毒性研究是药物安全性评价的重要内容,是药物进入临床试验及上市的重要环节,遗传毒性研究在很大程度上将影响到药物开发的进程^[10]。

Ames 试验为体外试验,是当前所有遗传毒性评价方法中对致癌物预测度最高的试验,其遗传学终点是基因突变,是通过能否引起鼠伤寒沙门菌基因组碱基置换或移码型突变来评价药物的,是化合物定量构效关系(QSAR)建立的遗传毒性筛选数据库的重要基础^[11]。本研究结果显示,银参胶囊对鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型4个菌株 TA97, TA98, TA100, TA102 均无致突变作用。小鼠骨髓 PCE 微核试验是用来评价外源性因素对人体细胞或体外培养细胞遗传学损伤的一个直观、有效、可行的方法^[12]。由于其能简便、快速、准确地检测出断裂剂和非整倍体诱导剂,故广泛应用于化合物遗传毒性筛选及评价^[13-14]。银参胶囊的微核试验中,未发现其对小鼠骨髓 PCE 的微核率有明显影响,可认为该试验为阴性。小鼠睾丸细胞染色体畸变试验广泛应用于评价食品、药品等对雄性小鼠生殖功能产生的影响,其机制主要是观察睾丸细胞染色体的形态改变^[15]。试验中亦未发现银参胶囊对小鼠睾丸染色体畸形发生率有明显影响。

综上所述,银参胶囊3项遗传毒性试验结果均为阴性,判定其遗传毒性安全。今后应开展多项研究,为开发更多新的功能提供科学依据,也为长期作业在特殊环境中的广大官兵健康维护提供新的产品。

致谢: 特别感谢江苏省疾控中心毒理与功能评价实验室的各位老师对本研究中试验方案给予的指导及在试验操作中所付出的努力。

参考文献:

[1] MENG QL, PAN JZ, LIU YJ, et al. Anti-tumour effects of

polysaccharide extracted from *Acanthopanax senticosus* and cell-mediated immunity[J]. *Experimental and therapeutic medicine*, 2018, 15(2): 1694-1701.

- [2] COY C, STANDISH LJ, BENDER G, et al. Significant Correlation between TLR2 Agonist Activity and TNF-alpha Induction in J774. A1 Macrophage Cells by Different Medicinal Mushroom Products[J]. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2015, 17(8): 713-722.
- [3] ZHOU YL, CHEN XY, RUO KY, et al. Immunomodulatory Effect of Tremella Polysaccharides against Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression in Mice[J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 239-251.
- [4] 刘月达. 刺五加注射液在神经内科疾病治疗中的应用及安全性评价[J]. *中国处方药*, 2016, 14(5): 45-46.
- [5] 曹德龙, 张 坚, 王晓霞. 刺五加注射液安全性评价[J]. *亚太传统医药*, 2014, 10(16): 27-28.
- [6] 文海若, 宋 捷, 鄂 蕊, 等. 微孔板与标准平皿 Ames 试验比较研究[J]. *药物评价研究*, 2019, 42(5): 884-889.
- [7] 张丽萍, 刘文君. 饮用水遗传毒性测试中和的敏感度和可靠度比较[J]. *生理毒理学报*, 2017, 12(5): 98-108.
- [8] 李元新, 刘来利, 王必成, 等. 亚硒酸钠小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验研究[J]. *畜牧兽医杂志*, 2016, 35(3): 20-21.
- [9] 赵 源, 吴文斌, 米金霞, 等. 体内外染色体畸变实验检测朱砂的遗传毒性[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(22): 143-147.
- [10] 黄芳华, 王庆利. 药物遗传毒性研究评价的技术要求与常见问题[J]. *中国新药杂志*, 2014, 23(18): 2112-2116.
- [11] CASSANO A, RAITANO G, MOMBELLI E, et al. Evaluation of QSAR Models for the prediction of Ames genotoxicity: A retrospective exercise on the chemical substances registered under the EU REACH regulation[J]. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2014, 32(3): 273-298.
- [12] 李学敏, 田若涛, 李建国, 等. 米糠蜡致畸和致突变作用的实验研究[J]. *中国预防医学杂志*, 2017, 18(11): 823-826.
- [13] ALEXANDROV K, ROJAS M, SATARUG S. The critical DNA damage by benzo(a) pyrene in lung tissues of smokers and approaches to preventing its formation [J]. *Toxicol Lett*, 2010, 198(1): 63-68.
- [14] 欧红梅, 涂宏刚, 周长慧, 等. 流式细胞术在体外微核分析中的应用进展[J]. *中国新药杂志*, 2014, 23(4): 427-431.
- [15] 黄天宏, 张 熠, 张 盈, 等. 螺旋藻多糖对小鼠精子和睾丸细胞染色体畸变研究[J]. *海峡药学*, 2017, 29(11): 15-17.

(收稿日期: 2019-08-07; 修回日期: 2019-09-11)