

冬虫夏草西洋参复合物的遗传毒性研究

朱 薇¹, 陈晓颀^{2*}, 汪 杨², 王 嫣²

1. 武汉工程大学, 湖北 武汉 430072

2. 湖北省药品监督检验研究院, 湖北 武汉 430075

摘 要: **目的** 通过遗传毒性研究, 评价冬虫夏草西洋参复合物的毒理学安全性。**方法** 按照 Ames 实验、小鼠骨髓细胞微核试验及小鼠精子畸形实验方法进行研究, 并对实验结果进行判定。**结果** 冬虫夏草西洋参复合物对雌、雄小鼠的急性毒性最大耐受剂量均大于 12.0 g/kg; Ames 实验中 5 个剂量组回变菌落数均未超过自发回变组的 2 倍, 且无剂量-反应关系; 复合物 3 个剂量组骨髓细胞微核实验中雌鼠微核率分别为 0.32%、0.36%、0.40%, 雄鼠微核率分别为 0.30%、0.32%、0.40%; 小鼠精子畸形实验中精子畸形率分别为 2.4%、2.3%、2.3%, 微核率和精子畸形率与对照组比较均无显著性增加 ($P>0.05$)。

结论 冬虫夏草西洋参复合物对小鼠无毒, 且未显示遗传毒性。

关键词: 冬虫夏草西洋参复合物; 急性毒性; 遗传毒性; Ames 实验; 骨髓细胞微核实验; 精子畸形实验

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)13-2722-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.13.021

Study on genetic toxicity of *Cordyceps sinensis* and *Panax quinquefolium* compound

ZHU Wei¹, CHEN Xiao-yong², WANG Yang², WANG Yan²

1. Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430072, China

2. HuBei Institute for Drug Control, Wuhan 430075, China

Abstract: Objective To evaluate toxicological safety of *Cordyceps sinensis* and *Panax quinquefolium* compound according to the genetic toxicity study. **Methods** Mice acute oral toxicity test, *Salmonella typhimurium* reverse mutation test, micronucleus test of mice bone marrow and mice sperm shape abnormality test were carried out in the compound. **Results** The MTD of the compound was greater than 12.0 g/kg BW for both male and female mice in the acute oral toxicity test, which shows non-toxic substance. The reverse mutation number of *Salmonella typhimurium* reverse mutation test in five dose groups did not exceed 2-fold of the spontaneous revertant colony number, nor was there a dose-response relationship, the result of Ames test was negative. Micronucleus rate of each dose group for female mouse were 0.32%, 0.36%, and 0.40%, respectively. Micronucleus rate of each dose group for male mouse were 0.30%, 0.32%, and 0.40%, respectively. Sperm shape abnormality rate of each dose group were 2.4%, 2.3%, and 2.3%, respectively. Micronucleus rate and sperm shape abnormality rate had no significant increase compared with the negative control. The results of micronucleus test of mice bone marrow and mice sperm shape abnormality test were negative. **Conclusion** Under this experimental condition, the genetic toxicity of the compound is not found, and it is classified as non-toxic.

Key words: *Cordyceps sinensis* and *Panax quinquefolium* compound; acute toxicity; genetic toxicity; Ames test; bone marrow micronucleus test; sperm shape abnormality test

冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (BerK.) Sacc. 为我国特有名贵中药材, 能同时调节体液免疫和细胞免疫, 对单核-巨噬细胞系统具有广泛的激活作用^[1], 化学成分包括核苷和碱基类化合物、多糖类成分、甾醇、糖醇类成分、氨基酸成分、脂肪酸、酯、烷烃、维生素类成分以及无机元素等^[2-3]。西洋参

Panax quinquefolium L. 是名贵的益气养阴药之一, 具有补气养阴、清热生津的作用, 含有多种人参皂苷和多糖类物质, 具有增强免疫的作用^[4-5]。目前, 冬虫夏草西洋参复合物在医院中药调剂及保健食品领域应用较广, 关于冬虫夏草西洋参复合物增强免疫作用的研究已有报道^[6]。由于 2 种药材化学成分复杂, 配

收稿日期: 2017-04-14

基金项目: 湖北省科技支撑计划项目 (2014BEC094)

作者简介: 朱 薇, 女, 博士, 讲师, 研究方向为药物制剂及辅料研究。E-mail: 506219744@qq.com

*通信作者 陈晓颀, 女, 硕士, 副主任药师, 研究方向为中药制剂及质量控制。Tel: (027)87705271 E-mail: 57277100@qq.com

伍后可能发生复杂变化,配伍后是否产生增毒作用,或生成新的有害物质,相应的毒理学报道较少。本研究旨在通过对冬虫夏草西洋参复合物的急性毒性和遗传毒性研究,为药品的安全使用提供参考,为后期研究提供依据。

1 材料

1.1 药物

冬虫夏草西洋参复合物,黄白色至浅灰色粉末,味微腥而甘苦,北京海德润制药有限公司生产,批号 20141210,规格 0.3 g/粒,人体推荐量每日 2 次,每次 3 粒,计 0.03 g/(kg·d) (人体质量按 60 kg 计算)。密闭置于常温干燥处保存,保质期 24 个月。环磷酰胺,批号 A0164185,Acros 公司;伊红染料,生产批号 20140109,国药集团化学试剂有限公司;Giemsa 染液,批号 BCBK3240V, Sigma 公司;叠氮钠,批号 080507,成都市科龙化工试剂厂;2-氨基苄,批号 YK2012062901,苏州亚科化学试剂股份有限公司;敌克松,批号 SLBC6145V, Sigma 公司;1,8-二羟基蒽醌,批号 STBD7414V, Sigma 公司;大鼠肝 S-9 液,批号 3247,美国 Moltox 公司。

1.2 实验动物

SPF 级昆明种小鼠,由武汉生物制品研究所有限责任公司(用于急性毒性实验及骨髓细胞微核实验)和湖北省实验动物研究中心(用于小鼠精子畸形实验)提供,实验动物生产许可证号分别为 SCXK(鄂)2012-0003、SCXK(鄂)2008-0005。饲养条件:实验动物饲养于湖北省食品药品监督检验研究院,实验动物使用许可证号 SYXK(鄂)2014-0009。

1.3 实验菌株

Ames 实验采用组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门菌 TA-97、TA-98、TA-100、TA-102,购自 Moltox 公司。

2 方法^[7]

2.1 小鼠急性毒性实验(最大耐受量法)

选取 SPF 级昆明种小鼠,20 只,雌雄各半,体重 18~22 g。冬虫夏草西洋参复合物剂量设计为 12.0 g/kg,相当于人体推荐量 400 倍。冬虫夏草西洋参复合物用蒸馏水配制成最大质量浓度为 0.3 g/mL,最大 ig 给药体积 20 mL/kg,每天给药 2 次。第 1 次给药前 16 h 动物禁食不禁水,2 次给药间隔 4 h。给药后连续观察 14 d,并记录动物中毒症状和死亡情况。

2.2 小鼠精子畸形实验

选取 SPF 级昆明种小鼠,25 只,雄性,体重 25~35 g,随机分成 5 组,每组 5 只。设冬虫夏草

西洋参复合物高、中、低剂量(6.0、3.0、1.5 g/kg)组,环磷酰胺(40 mg/kg)阳性对照组,对照组。

冬虫夏草西洋参复合物用蒸馏水配制成 2 mg/mL,对照组 ig 给予等体积蒸馏水,给药组 ig 相应药物,每天 1 次,连续 5 d,给药体积 20 mL/kg。首次给予受实物的第 35 天颈椎脱臼处死小鼠,取出两侧附睾,置入预先加有 2 mL 生理盐水的培养皿,将附睾纵向剪 1~2 刀,静置 5 min,滤过后吸滤液涂片。空气干燥后,用甲醇固定、1%伊红染色,用蒸馏水冲洗、晾干。每只动物计数 1 000 个结构完整的精子,计算畸形精子发生率。

2.3 小鼠骨髓细胞微核实验(30 h 给受试物法)

选择 SPF 级昆明种小鼠,50 只,雌雄各半,体重 25~30 g,随机分成 5 组,每组雌雄各 5 只。分组、剂量设计及小鼠给药体积同“2.2”项。2 次给受试物间隔 24 h,第 2 次给受试物后 6 h,颈椎脱臼处死动物,取股骨骨髓涂片,甲醇固定后 Giemsa 染色,用蒸馏水冲洗、晾干。油镜下观察每只动物 1 000 个嗜多染红细胞(PCE),计数含有微核的 PCE 数;每只动物计数 200 个嗜多染红细胞,并同时计数成熟红细胞(NCE),计算 PCE/(PCE+NCE)。

2.4 Ames 实验(平板掺入法)

采用经鉴定符合生物学要求的组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 TA97、TA98、TA100、TA102 菌株进行实验,并用大鼠肝匀浆 S9 作为体外活化系统。受试物分别设每皿 5 000、1 000、200、40、8 μ g 剂量组,同时设溶剂对照、空白对照(自发回变)、阳性对照(叠氮钠、2-氨基苄、敌克松、1,8-二羟基蒽醌),每剂量、每种系统均做 3 个平皿,37 $^{\circ}$ C,培养 48 h,计数每皿回变菌落数。

3 结果

3.1 急性毒性实验结果

14 d 观察期内,所有动物中枢神经系统及躯体运动、自主神经系统、呼吸系统、循环系统、毛色、行为、分泌物、排泄物正常,未见明显中毒症状,无动物死亡。实验期间,小鼠体质量正常增长,表明冬虫夏草西洋参复合物对小鼠经口给药的最大耐受量大于 12.0 g/kg,属无毒级。

3.2 小鼠精子畸形实验结果

冬虫夏草西洋参复合物各剂量组与对照组比较均差异不显著($P>0.05$),环磷酰胺组与对照组比较差异显著($P<0.01$),表明冬虫夏草西洋参复合物对精子无致畸作用,见表 1。

表 1 冬虫夏草西洋参复合物对小鼠精子形态的影响

Table 1 Effect of *C. sinensis* and *P. quinquefolium* compound on sperm morphology of mice

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物 数/只	观察精子 总数/个	畸形精子/个					精子畸形 率/%	
				无钩	香蕉形	胖头	无定形	其他 [▲]		总数
对照	—	5	5 000	25	18	15	46	9	113	2.3±0.2
冬虫夏草西洋参复合物	6.0	5	5 000	44	20	20	35	2	121	2.4±0.1
	3.0	5	5 000	44	21	18	30	3	116	2.3±0.1
	1.5	5	5 000	43	15	20	36	2	116	2.3±0.1
	0.04	5	5 000	180	77	74	155	36	522	10.4±0.4 ^{**}

[▲]其他畸形包括尾折叠、双头、双尾等；与对照组比较：***P*<0.01[▲]Other abnormalities include tail fold, double head, double tail, etc; ***P*<0.01 vs control group

3.3 小鼠骨髓细胞微核实验结果

冬虫夏草西洋参复合物按 6.0、3.0、1.5 g/kg 剂量于 30 h 内分 2 次 ig 给药，各剂量组与对照组比较差异不显著 (*P*>0.05)，环磷酰胺组与对照组比较差异显著 (*P*<0.01)；冬虫夏草西洋参复合物各剂量组 PCE/(PCE+NCE)均未小于对照组的 20%；表明骨髓细胞微核实验结果为阴性，见表 2。

3.4 Ames 实验结果

冬虫夏草西洋参复合物对鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 实验菌株，在加及不加 S9 混合液时，每皿 5 000、1 000、200、40、8 μg 剂量组回变菌落数均未超过溶剂对照组回变菌落数 2 倍，亦无剂量-回变反应关系，表明冬虫夏草西洋参复合物 Ames 实验结果为阴性，2 次实验结果见表 3、4。

表 2 冬虫夏草西洋参复合物对小鼠骨髓微核发生率的影响

Table 2 Effect of *C. sinensis* and *P. quinquefolium* compound on incidence of bone marrow micronucleus in mice

性别	组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物 数/只	PCE/ 个	NCE/ 个	[PCE/(PCE+NCE)]/%	微核		
							观察 PCE/个	微核数/个	微核率/%
雌性	对照	—	5	1 000	862	53.8±2.6	5 000	16	0.32±0.13
	冬虫夏草西洋参复合物	6.0	5	1 000	851	54.4±2.4	5 000	16	0.32±0.08
		3.0	5	1 000	814	55.0±3.4	5 000	18	0.36±0.11
		1.5	5	1 000	757	56.1±2.5	5 000	20	0.40±0.07
		0.04	5	1 000	1 270	44.1±1.3**	5 000	147	2.94±0.30**
雄性	对照	—	5	1 000	845	54.4±3.8	5 000	17	0.34±0.09
	冬虫夏草西洋参复合物	6.0	5	1 000	765	56.8±2.9	5 000	15	0.30±0.07
		3.0	5	1 000	794	55.9±3.0	5 000	16	0.32±0.08
		1.5	5	1 000	826	55.0±4.4	5 000	20	0.40±0.12
		0.04	5	1 000	1 296	43.6±1.9**	5 000	153	3.06±0.32**

与对照组比较：***P*<0.01***P*<0.01 vs control group表 3 冬虫夏草西洋参复合物 Ames 实验第 1 次实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 3 Ames test results for first time of *Cordyceps sinensis* and *Panacis quinquefolium* compound ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	每皿 加药量/μg	TA97		TA98		TA100		TA102	
		不加 S ₉	加 S ₉	不加 S ₉	加 S ₉	不加 S ₉	加 S ₉	不加 S ₉	加 S ₉
冬虫夏草西洋参复合物	5 000	159±7	155±9	34±3	35±3	162±6	163±4	271±9	270±14
	1 000	162±10	161±8	34±3	36±2	168±3	165±5	265±7	262±5
	200	156±11	158±6	34±2	34±2	164±7	163±6	265±9	266±3
	40	156±11	161±6	35±3	35±3	162±5	159±8	269±5	266±8
	8	153±11	155±6	35±1	35±4	161±7	164±6	265±9	267±9
溶剂对照	—	156±8	155±12	34±2	34±2	161±4	159±10	269±12	267±9
空白对照	—	155±14	154±13	35±2	35±4	163±9	163±10	271±8	269±13
2-氨基苄	10	—	1 968±132	—	2 392±169	—	1 512±108	—	—
1,8-二羟基蒽醌	50	—	—	—	—	—	—	—	1 237±59
敌克松	50	1 880±194	—	2 307±188	—	—	—	1 192±58	—
叠氮钠	2.5	—	—	—	—	1 467±86	—	—	—

表 4 冬虫夏草西洋参复合物 Ames 实验第 2 次实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Ames test results for second time of *Cordyceps sinensis* and *Panaxis quinquefolium* compound ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	每皿加药量/ μg	TA97		TA98		TA100		TA102	
		不加 S_9	加 S_9	不加 S_9	加 S_9	不加 S_9	加 S_9	不加 S_9	加 S_9
冬虫夏草西洋参复合物	5 000	162 $\pm$ 12	162 $\pm$ 7	34 $\pm$ 2	34 $\pm$ 1	160 $\pm$ 6	162 $\pm$ 5	274 $\pm$ 8	274 $\pm$ 9
	1 000	157 $\pm$ 12	161 $\pm$ 6	35 $\pm$ 4	34 $\pm$ 2	165 $\pm$ 3	165 $\pm$ 7	267 $\pm$ 9	267 $\pm$ 8
	200	163 $\pm$ 7	162 $\pm$ 8	35 $\pm$ 2	34 $\pm$ 4	159 $\pm$ 13	162 $\pm$ 7	268 $\pm$ 13	270 $\pm$ 11
	40	161 $\pm$ 7	161 $\pm$ 3	35 $\pm$ 4	35 $\pm$ 3	167 $\pm$ 4	161 $\pm$ 10	266 $\pm$ 13	267 $\pm$ 10
	8	163 $\pm$ 6	162 $\pm$ 11	34 $\pm$ 2	34 $\pm$ 3	160 $\pm$ 4	164 $\pm$ 7	273 $\pm$ 17	273 $\pm$ 9
溶剂对照	—	161 $\pm$ 9	159 $\pm$ 10	35 $\pm$ 3	36 $\pm$ 2	162 $\pm$ 15	161 $\pm$ 14	267 $\pm$ 12	265 $\pm$ 7
空白对照	—	163 $\pm$ 6	160 $\pm$ 11	34 $\pm$ 3	35 $\pm$ 2	166 $\pm$ 4	163 $\pm$ 8	271 $\pm$ 16	273 $\pm$ 11
2-氨基苄	10	—	1 797 $\pm$ 109	—	2 371 $\pm$ 68	—	1 531 $\pm$ 178	—	—
1,8-二羟基蒽醌	50	—	—	—	—	—	—	—	1 221 $\pm$ 26
敌克松	50	1 811 $\pm$ 190	—	2 309 $\pm$ 90	—	—	—	1 243 $\pm$ 106	—
叠氮钠	2.5	—	—	—	—	1 525 $\pm$ 99	—	—	—

4 讨论

冬虫夏草西洋参复合物将冬虫夏草粉和西洋参粉混合过筛制成,前期功效实验表明其对小鼠细胞免疫功能、体液免疫功能、吞噬功能和 NK 细胞活性均有增强作用,促进了小鼠的特异性免疫和非特异性免疫^[6]。中药配伍后可能发生复杂变化,不合理的配伍可产生增毒作用,产生新的有害物质,甚至数种无毒的药物在使用上因配伍不当也可产生有毒物质导致毒副作用的发生^[8],因而对中药复合物的遗传毒性研究显得尤为重要。

遗传毒性实验采用细胞或生物体来研究导致人体基因改变,并能通过生殖细胞传递至下一代的潜力,通过测定基因突变和染色体损伤的实验可得出某种致突变物质的最初信息。遗传终点具有多样化特性,导致单个实验系统不可能涵盖多个遗传终点的检测,因此探查这些终点需进行一系列实验。本研究采用 Ames 实验、精子畸形实验和微核实验这一组合实验,通过检测原核生物基因突变、真核生物雄性生殖细胞损伤毒性和体细胞染色体损伤毒性,从不同的遗传学终点和靶细胞的角度,对冬虫夏草西洋参复合物的遗传毒性进行了分析。

在急性毒性实验中小鼠的耐受剂量大于 12.0 g/kg,属于无毒物质。在遗传毒性实验中,小鼠骨髓细胞微核实验和小鼠精子畸形实验在 6.0、3.0、1.5 g/kg 3 个剂量组中,与对照组比较均无显著性差异;Ames 实验中,无论是否存在代谢活化系统,

冬虫夏草西洋参复合物各剂量组对 4 株组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA1024 的回变菌落数均未超过溶剂对照组回变菌落数的 2 倍,亦无可重复的并有统计学意义的阳性反应的测试点,Ames 实验结果未显示致突变性。综上所述,从毒理学角度可以认为冬虫夏草西洋参复合物属于无毒级物质,Ames 实验、精子畸形实验和微核实验结果均为阴性,表明在本实验条件下,冬草夏草西洋参复合物未显示有遗传毒性作用。

参考文献

- [1] 喻林红,林 伟. 冬虫夏草的化学成分和药理作用及临床应用 [J]. 海峡药学, 2013, 25(12): 63-66.
- [2] 李凤荣. 冬虫夏草的化学成分及药理学研究概况 [J]. 内蒙古中医药, 2010(17): 102-105.
- [3] 孙 娜,崔建美,李继安,等. 冬虫夏草的化学成分与药理作用分析研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(4): 65-67.
- [4] 尚金燕,李桂荣,邵明辉,等. 西洋参的药理作用研究进展 [J]. 人参研究, 2016(6): 49-51.
- [5] 于晓娜,崔 波,任贵兴. 西洋参多糖的研究进展 [J]. 食品科学, 2014, 35(9): 301-305.
- [6] 邱 涵,吕晓君,张 鹏. 冬虫夏草西洋参复合物增强免疫力功能实验研究 [J]. 中国医药导报, 2016, 13(9): 18-22.
- [7] 保健食品检验与评价技术规范 [S]. 2003.
- [8] 吴 彦,杨 鸿,钟菊迎,等. 中药复方藿莲香 I 号的遗传毒理学研究 [J]. 中国药物警戒, 2014, 11(11): 649-656.