

毛蚶提取物的遗传毒性试验研究

高梅, 曹冲, 汤连升, 马会, 张森, 朱春花

山东省药学科学院, 山东省化学药物重点实验室, 山东 济南 250101

摘要: 目的 评价毛蚶提取物的遗传毒性, 为评价其安全性提供毒理学依据。方法 选用体外细菌回复突变 (Ames) 试验、中国仓鼠肺细胞 (CHL) 体外染色体畸变试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验, 进行毛蚶提取物的遗传毒性研究。Ames 试验设 5 000.0、2 500.0、1 250.0、625.0、312.5 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 5 个剂量; 体外 CHL 细胞染色体畸变试验, 设立 5.00、2.50、1.25 mg/mL 3 个剂量, 毛蚶提取物与 CHL 细胞分别接触 6、24 h; 小鼠骨髓微核试验, 设立 5 000、2 500、1 250 mg/kg 3 个剂量, 给药 1 次。结果 Ames 试验, 毛蚶提取物在加与不加 S9 时各剂量组回变菌落数均未超过自发回变菌落数的 2 倍, 亦无剂量相关性, 结果为阴性; CHL 染色体畸变试验, 毛蚶提取物代谢活化组和非代谢活化组的染色体畸变率均低于 5%, 染色体畸变试验结果为阴性。小鼠骨髓微核试验, 各剂量组的微核率与阴性对照组比较, 差异不显著, 结果为阴性。结论 在本试验条件下, 毛蚶提取物未见潜在的遗传毒性。

关键词: 毛蚶提取物; 遗传毒性; 体外细菌回复突变试验; 中国仓鼠肺细胞体外染色体畸变试验; 微核试验

中图分类号: R994.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2016)03-0357-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.03.005

Genotoxicity of extract from *Arca subcrenata*

GAO Mei, CAO Chong, TANG Lian-sheng, MA Hui, ZHANG Sen, ZHU Chun-hua

Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Shandong Provincial Key Laboratory of Chemical Drug, Jinan 250101, China

Abstract: Objective To assess the genotoxicity of extract from *Arca subcrenata*, in order to provide toxicological basis for evaluating its safety. **Methods** Ames test, CHL chromosome aberration assay, and bone marrow micronucleus assay in mice were used. In Ames test, there were five dose groups respectively at follows: 5000.0, 2500.0, 1250.0, 625.0, and 312.5 mg/plate . In CHL chromosome aberration assay, the doses were 5.00, 2.50, and 1.25 mg/mL , exposure time were 6 and 24 h. *In vivo* micronucleus assay, there were 3 dose groups: 5000, 2500, 1250 mg/kg , for just once. **Results** In Ames test, in the presence of S9 mixture or not, the number of revertant colonies 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. At the concentration of 1.25—5.00 mg/mL , the extract from *A. subcrenata* achieved a chromosome aberration of less than 5% with or without S9 mixture, negative response was found. In bone marrow micronucleus assay, compared with negative control group, micronucleus rate of each dose group showed no significant difference, and the result was negative. **Conclusion** Under this conditions, no genotoxicity was observed in the extract from *A. subcrenata*.

Key words: extract from *Arca subcrenata*; genotoxicity; Ames test; CHL chromosome aberration assay; micronucleus assay

毛蚶 *Arca subcrenata* Lischke 是沿海地区常见的经济贝类, 肉味鲜美, 具补血、健脾等功效, 同时还具有一定的药用价值。研究表明, 毛蚶提取物中含有丰富的蛋白质、糖类、氨基酸及微量元素铁等物质^[1], 具有广泛的药理活性, 提取物中的蛋白类具有抗炎、抗肿瘤活性和清除自由基等作用, 多糖类具有免疫调节作用等^[2-6], 但对其遗传毒理研究报道较少。为了解毛蚶提取物的致突变性, 根据药物遗传毒性研究技术指导原则规定^[7], 本研究选用

体外细菌回复突变 (Ames) 试验、中国仓鼠肺细胞 (Chinese hamster lung cells, CHL) 体外染色体畸变试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验进行毛蚶提取物的遗传毒性研究, 为安全用药提供试验依据。

1 材料

1.1 菌株

组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门菌 TA97a、TA98、TA100、TA102、TA1535, 购自美国 MOLTOX 公司, 经生物学鉴定符合试验要求。

收稿日期: 2016-01-08

作者简介: 高梅 (1983—), 女, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为药物安全性评价。E-mail: gaomei729@163.com

1.2 细胞

CHL 细胞, 购自中国科学院上海生命科学研究院, 检测无支原体污染。

1.3 动物

昆明小鼠, SPF 级, 体质量 20~24 g, 雌雄各半, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 生产许可证号 SCXK(京)2012-0001。试验在本单位药物安全性评价中心屏障环境动物实验设施进行, 实验动物使用许可证号 SYXK(鲁)2012-0004。

1.4 主要试剂

毛蚶提取物, 由山东省医药工业研究所提供, 批号 121108, 每克提取物相当于 7 克生药, 给药剂量均以提取物量计算; 敌克松, 美国 Supelco 公司, 批号 408-98A; 叠氮钠, 美国 Amresco 公司, 批号 416A052; 2-氨基苄、1, 8-二羟基蒽醌, 美国 Sigma 公司, 批号分别为 S90850V、STBC1841V; RPMI 1640, 北京赛默飞世尔生物化学制品有限公司, 批号 NYB0806; 胎牛血清, 杭州四季青公司, 批号 130105; 注射用丝裂霉素, 浙江海正药业股份有限公司, 批号 120801; 环磷酰胺, 江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号 12032725; 肝微粒体酶 (S9), 美国 MOLTOX 公司。

1.5 主要仪器

YXQ-LS-50A 全自动立式压力蒸汽灭菌器、SPX-250B-Z 生化培养箱、BC-J160S CO₂ 细胞培养箱, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; AUW120D 电子分析天平, 中国岛津企业管理有限公司; ZHWY-100B 恒温培养振荡器, 上海智城分析仪器制造有限公司; BDS200 倒置生物显微镜, 重庆奥特光学仪器有限责任公司; E100 生物显微镜, 日本尼康公司。

2 方法^[8-11]

2.1 Ames 试验

选用 TA97a、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 5 种菌株, 试验在加 S9 和不加 S9 平行条件下测试, 参照指导原则^[7], 每一菌株分别设毛蚶提取物 5 个浓度组, 分别为 5 000.0、2 500.0、1 250.0、625.0、312.5 μg/皿; 阴性对照组加入 0.9%氯化钠注射液; 阳性对照组, 不加 S9 混合液时, TA97、TA98、TA102 加入 500 μg/mL 的敌克松; TA100、TA1535 加入 15 μg/mL 叠氮钠; 加 S9 混合液时, TA97、TA98、TA100 加入 2-氨基苄, TA102 加入 1, 8-二羟基蒽醌, 浓度均为 500 μg/mL; TA1535 加入 2 mg/mL

的注射用环磷酰胺。采用平皿掺入法, 每组均设 3 个平行皿, 37 °C 培养 48 h 后, 计数每皿的回变菌落数。试验重复 1 次。结果表示为每皿的回复突变菌落数。

2.2 染色体畸变试验

取生长良好的 CHL 细胞, 以 10⁵/mL 浓度接种于 25 cm² 细胞培养瓶 (5 mL/瓶), 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中过夜。培养 24 h 后, 吸取培养瓶中的培养液, 加入毛蚶提取物, 使其终浓度分别为 5.00、2.50、1.25 mg/mL, 分别培养 6、24 h, 6 h 设立代谢活化组, S9 终浓度为 1%; 阴性对照组加入 0.9%氯化钠注射液; 阳性对照组在不加 S9 混合液时为丝裂霉素, 浓度为 0.15 μg/mL (6 h 组) 和 0.05 μg/mL (24 h 组), 加 S9 混合液时为环磷酰胺, 浓度为 20 μg/mL。分别于培养结束前 4 h 加入秋水仙素, 使染色体停滞在分裂中期, 然后收细胞、制片、Giemsa 染色, 显微镜下观察 200 个中期分裂相细胞, 计数每组成细胞的染色体结构畸变。试验重复 1 次。

细胞畸变率 ≤ 5% 为阴性 (-); 5% ≤ 细胞畸变率 ≤ 10% 为可疑 (±); 10% ≤ 细胞畸变率 ≤ 20% 为阳性 (+); 20% ≤ 细胞畸变率 ≤ 50% 为阳性 (++) ; 细胞畸变率 > 50% 为阳性 (+++)。

2.3 小鼠骨髓微核试验

取健康昆明小鼠 60 只, 按体质量随机分为 5 组, 分别为毛蚶提取物 5 000、2 500、1 250 mg/kg 剂量组、阴性对照组、阳性对照组, 每组 12 只。阴性对照为 0.9%氯化钠注射液, 阳性对照为 50 mg/kg 注射用环磷酰胺溶液。毛蚶提取物、氯化钠注射液 ig 给予动物, 环磷酰胺溶液 ip 给予动物, 给药体积为 0.2 mL/10 g, 每天给药 1 次。给药后 24~48 h 制备胸骨骨髓涂片, 所有骨髓涂片经 Giemsa 染色后读片, 每只动物计数 2 000 个嗜多染红细胞的微核发生率 (MPNCE), 同时计数 200 个红细胞, 计算 PCE/(PCE+NCE) 的比值 (PCE: 嗜多染红细胞; NCE: 正染红细胞)。

2.4 统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 DAS 1.0 软件进行分析, 供试品各剂量组与对照组采用 *t* 检验, 进行方差统计学分析。

3 结果

3.1 Ames 试验

在有和无 S9 活化系统的条件下, 5 株菌株的阳性对照组均高于相应的阴性对照菌落数 2 倍以上,

差异显著 ($P < 0.01$), 说明试验系统可靠。毛蚶提取物在 312.5~5 000.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内回变菌落数均未高于相应菌株自发回变菌落数的 2 倍, 与阴性对照

组比较, 差异不显著 ($P > 0.05$), 且无剂量相关性, 结果见表 1。表明毛蚶提取物无诱导组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门菌基因突变作用。

表 1 毛蚶提取物 Ames 试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Results of extract from *A. subcrenata* in Ames test ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	S9	回变菌落数				
			TA97a	TA98	TA100	TA102	TA1535
阴性对照	—	—	104.33 ± 9.07	23.33 ± 3.51	110.00 ± 7.94	275.33 ± 15.63	20.00 ± 4.36
		+	111.33 ± 8.96	26.00 ± 4.58	112.33 ± 9.50	289.33 ± 7.09	22.67 ± 3.51
阳性对照	—	—	1528.00 ± 120.00*	1480.00 ± 153.26*	1386.67 ± 109.20*	2034.67 ± 140.02*	1408.00 ± 105.83*
		+	1424.00 ± 116.21*	1456.00 ± 76.32*	1448.00 ± 115.38*	1178.67 ± 95.44*	393.00 ± 46.68*
毛蚶提取物	312.5	—	109.33 ± 6.51	23.00 ± 5.00	109.33 ± 8.74	285.67 ± 11.72	20.00 ± 3.00
		+	115.33 ± 11.59	23.00 ± 2.65	114.33 ± 11.06	295.00 ± 9.85	20.67 ± 4.51
	625.0	—	110.33 ± 7.09	25.33 ± 3.21	110.33 ± 8.50	284.67 ± 5.51	20.67 ± 1.53
		+	105.67 ± 9.29	25.00 ± 3.00	115.00 ± 7.21	293.67 ± 8.33	22.33 ± 3.79
	1 250.0	—	105.33 ± 4.16	26.67 ± 4.51	109.33 ± 5.51	288.33 ± 9.45	22.00 ± 1.73
		+	110.33 ± 7.51	23.67 ± 1.53	115.00 ± 10.00	291.00 ± 8.72	20.33 ± 2.08
	2 500.0	—	109.33 ± 7.51	22.33 ± 4.04	110.33 ± 10.12	287.67 ± 10.02	21.00 ± 3.61
		+	113.00 ± 11.36	23.67 ± 3.51	112.33 ± 9.29	291.67 ± 13.32	20.33 ± 2.52
	5 000.0	—	109.33 ± 10.12	24.67 ± 3.51	111.33 ± 9.50	288.00 ± 4.58	19.67 ± 2.08
		+	109.00 ± 11.14	26.33 ± 6.11	115.33 ± 11.50	298.67 ± 11.15	21.67 ± 4.04

与阴性对照组比较: * $P < 0.01$

* $P < 0.01$ vs negative control group

3.2 染色体畸变试验

阳性对照中直接诱变剂丝裂霉素在 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下, CHL 细胞染色体畸变率显著增高至 35.5%; 在 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下, CHL 细胞染色体畸变率显著增高至 27%; 间接诱变剂环磷酰胺在 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下, 经 S9 活化, 染色体畸变率升高至 28%; 结果判断为阳性。而阴性对照组在有 S9 和无 S9 两种测试条件下, 染色体结构畸变率均小于 5%, 结果判断为阴性, 说明试验系统可靠。毛蚶提取物在 1.25~5.00 mg/mL 剂量范围内, 在活化系统和非活化系统两种测试条件下, 6 和 24 h 收获 CHL 细胞进行染色体畸变分析, 各剂量组的染色体畸变率均小于 5%, 未诱发明显的染色体畸变, 且未呈现剂量-效应关系, 结果判定为阴性。结果见表 2。

3.3 小鼠骨髓微核试验

结果显示, 阴性对照组与阳性对照组的 PCE/(PCE+NCE) 比值差异不显著 ($P > 0.05$), MPNCE 差异显著 ($P < 0.01$), 说明试验系统可靠。统计分析, 毛蚶提取物各剂量组给药 24~48 h 后取材, PCE/(PCE+NCE) 比值与阴性对照组比较, 差异不显著 ($P > 0.05$), 表明对骨髓细胞的造血功能没

有产生抑制作用, 各剂量组微核率与阴性对照组比较, 差异不显著 ($P > 0.05$)。说明毛蚶提取物各剂量组对小鼠骨髓细胞无致微核作用。

4 讨论

药物遗传毒性, 是指药物诱发的遗传物质在染色体水平、分子水平和碱基水平上的各种损伤而造成的毒性作用, 主要包括药物致染色体畸变、药物致 DNA 损伤和药物致基因突变 3 类。对药物进行遗传毒性研究是药物非临床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, 在降低临床试验受试者和药品上市后使用人群的用药风险方面发挥重要作用。根据受试物的化学结构、理化性质及对遗传物质作用终点的不同, 我国药物遗传毒性研究技术指导原则推荐遗传毒性试验组合由以下几个试验: 体外细菌基因突变试验、染色体损伤细胞遗传试验 (体外中期染色体畸变试验或微核试验)、体内遗传毒性试验 (啮齿类动物造血细胞染色体损伤试验或体内中期细胞微核或染色体畸变试验)。

毛蚶提取物是从鲜毛蚶软体部分提取而来, 对它的研究主要集中在其抗肿瘤、抗氧化、清除自由基等药理活性方面^[12-15], 但对其毒理研究报道甚少,

表 2 毛蚶提取物对 CHL 细胞染色体畸变试验结果

Table 2 Results of chromosomal aberration assay in CHL cells induced by extract from *A. subcrenata*

组别	剂量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	作用 S9	时间/ h	观察 细胞 数	畸变类型							畸变 细胞 数	畸变 率/%	结果 判断	
					多倍 体	染色单 体断裂	断片	双着 丝点	环状染 色体	染色单 体交换	裂隙				粉碎
阴性对照	—	—	6	200	0	0	1	0	0	1	0	0	2	1.0	—
丝裂霉素	0.15	—	6	200	0	10	3	2	1	48	0	0	61	35.5	++
毛蚶提取物	1 250	—	6	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0.5	—
	2 500	—	6	200	0	1	0	0	0	1	0	0	2	1.0	—
	5 000	—	6	200	0	2	1	0	0	0	0	0	3	1.5	—
阴性对照	—	—	24	200	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.5	—
丝裂霉素	0.05	—	24	200	0	21	0	1	1	40	2	0	54	27.0	++
毛蚶提取物	1 250	—	24	200	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.5	—
	2 500	—	24	200	0	1	0	0	0	1	0	0	2	1.0	—
	5 000	—	24	200	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0.5	—
阴性对照	—	+	6	200	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0.5	—
环磷酸胺	20	+	6	200	0	13	1	2	0	41	0	0	56	28.0	++
毛蚶提取物	1 250	+	6	200	0	1	1	0	0	0	0	0	2	1.0	—
	2 500	+	6	200	0	1	0	0	0	1	0	0	2	1.0	—
	5 000	+	6	200	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.5	—

表 3 毛蚶提取物对小鼠骨髓微核率形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Results of bone marrow micronucleus assay for extract from *A. subcrenata* ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	观察细胞数	微核率/‰		PCE/ (NCE+PCE)	
			24 h	48 h	24 h	48 h
阴性对照	—	2 000	1.17±0.52	1.33±0.41	0.68±0.03	0.68±0.03
阳性对照	50	2 000	24.42±3.81*	24.50±3.29*	0.67±0.02	0.68±0.02
毛蚶提取物	1 250	2 000	1.25±0.42	1.17±0.26	0.67±0.03	0.68±0.02
	2 500	2 000	1.08±0.20	1.33±0.41	0.59±0.22	0.68±0.03
	5 000	2 000	1.08±0.38	1.08±0.49	0.68±0.03	0.68±0.02

与阴性对照组比较: * $P < 0.01$

* $P < 0.01$ vs negative control group

尤其是遗传毒性的问题。因此,本试验对毛蚶提取物进行了体外致突变作用的评价,采用 Ames 试验、CHL 细胞体外染色体畸变试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验,从基因水平、染色体水平、动物水平,采用体内、体外试验相结合,研究了毛蚶提取物的遗传毒性。3 个试验剂量的设计,都是指导原则所要求的最大剂量,使得药物暴露量得到了保证,同时均设立阴性、阳性对照,保证了试验系统的可靠性。其中,小鼠骨髓微核试验,指导原则规定骨髓采样时间,如果采用单次给药,至少应采样 2 次,骨髓采样时间应在给药后 24~48 h 内,如果采用重复给药,可只采样 1 次,骨髓采样时间应在末次给药后 18~24 h。本实验采取第 1 种方案,即毛蚶提

取物染毒 1 次,药后 24~48 采样 2 次,以便取样点能覆盖微核形成高峰期。研究表明,在本试验条件下,毛蚶提取物在 312.5~5 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量范围内,无诱发鼠伤寒沙门氏菌基因突变作用,结果显示为阴性;在 1.25~5.0 mg/mL 浓度范围内,未见诱发 CHL 细胞染色体畸变作用;在所测 1 250~5 000 mg/kg 剂量范围内无诱发嗜多染红细胞微核率增高的作用,小鼠骨髓微核试验呈阴性。表明在本实验条件下,毛蚶提取物未见潜在的遗传毒性。但是,对于毛蚶提取物的其它毒性,如长期毒性等,还需进一步的动物体内试验研究。

参考文献

[1] 李 谦,李泰明,王香琴,等. 毛蚶提取物生化性质初

- 步分析 [J]. 药物生物技术, 1998, 5(4): 245-247.
- [2] 付莹, 冯婷, 赵晨, 等. 毛蚶蛋白抗肿瘤活性研究 [J]. 癌变 畸变 突变, 2014, 26(6): 412-418.
- [3] Xian J H, Li Y S, Li J H, *et al.* Antitumor effect of a polypeptide fraction from *Arca subcrenata* *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mar Drugs*, 2012, 10(12): 2782-2794.
- [4] Li Y S, Sheng F R, Rong M Y, *et al.* Purification, characterization and *in vitro* anti-tumor activity of proteins from *Arca subcrenata* lischke [J]. *Mar Drugs*, 2008, 6(3): 418-430.
- [5] Li Y S, Ting F L, Rong M Y, *et al.* Antioxidant activities of hydrolysates of *Arca subcrenata* prepared with three proteases [J]. *Mar Drugs*, 2008, 6(4): 607- 619.
- [6] 黄演君, 宋丽艳, 于荣敏. 毛蚶多肽提取物的体外免疫活性 [J]. 中国生化药物杂志, 2011, 32(4): 273-280.
- [7] 《药物遗传毒性研究技术指导原则》课题研究组. 药物遗传毒性研究技术指导原则 [S]. 国家食品药品监督管理局药品审评中心, 2007: 7-10.
- [8] 《药物遗传毒性研究技术指导原则》课题研究组. 药物遗传毒性研究技术指导原则 [S]. 国家食品药品监督管理局药品审评中心, 2007: 24-32.
- [9] 袁伯俊, 廖明阳, 李波. 药物毒理学实验方法与技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [10] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范 [S]. 2003: 189-207.
- [11] Ogura R, Ikeda N, Yuki K, *et al.* Genotoxicity studies on green tea catechin [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(6): 2190- 2200.
- [12] 王莉, 何赟绵, 姚全胜. 毛蚶多糖免疫调节作用的实验研究 [J]. 华西药学杂志, 2009, 24(4): 340-342.
- [13] 燕春义, 申洪波, 王哲. 毛蚶水提取物对荷瘤小鼠免疫功能的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(4): 656-657.
- [14] 王勇, 杨静, 孙岫, 等. 毛蚶水提取物的抗氧化活性分析 [J]. 中国海洋药物, 2008, 27(3): 11-14.
- [15] 吴思聪, 张哲绚. 毛蚶清除氧自由基作用的研究 [J]. 现代食品科技, 2010, 40(17): 9288-9289.