

蝉花孢梗束的毒性研究

孙长胜^{1,2,3,4}, 尹彬^{3,4}, 李春如^{3,4}, 陈桃宝^{3,4}, 龙文君^{3,4}, 王静春^{3,4}, 周宏灏^{1,2*}, 王玉芹^{3,4*}

1. 中南大学湘雅医院 临床药理研究所, 湖南 长沙 410008

2. 遗传药理学湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410078

3. 浙江泛亚生命科学研究院, 浙江 平湖 314200

4. 浙江泛亚生物医药股份有限公司, 浙江 平湖 314200

摘要: **目的** 对人工培植的蝉花孢梗束进行毒理学研究, 评价其口服安全性。**方法** 利用急性毒性试验、体外中国仓鼠肺细胞染色体畸变试验、骨髓细胞微核试验、鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验和孕鼠致畸试验进行毒理学评价。**结果** 急性毒性试验结果表明蝉花孢梗束对雌、雄大鼠急性经口最大耐受量 (MTD) 均 >10 g/kg, 属于无毒级; 中国仓鼠肺细胞染色体畸变试验、骨髓细胞微核试验、鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验以及3项遗传毒性试验的结果皆为阴性, 未显示致突变性; 蝉花孢梗束各剂量组在大鼠孕中期质量、死胎率、吸收胎率与阴性对照组比较差异无显著性 ($P>0.05$), 各剂量组胎鼠质量、胎鼠身长、前囟宽度与阴性对照组比较差异无显著性 ($P>0.05$); 各剂量组在胎鼠外观、内脏发育、骨骼发育检查上与阴性对照组比较差异无显著性 ($P>0.05$)。**结论** 在本研究条件下, 未见蝉花孢梗束有急性毒性、遗传毒性, 对孕鼠无致畸作用, 具有良好的安全性。

关键词: 蝉花孢梗束; 急性毒性实验; 遗传毒性实验; 致畸实验

中图分类号: R285.5, R996.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2020) 04-0648-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.04.011

Studies on toxicity of *Isaria cicadae* synnemata

SUN Changsheng^{1,2,3,4}, YIN Bin^{3,4}, LI Chunru^{3,4}, CHEN Taobao^{3,4}, LONG Wenjun^{3,4}, WANG Jingchun^{3,4}, ZHOU Honghao^{1,2}, WANG Yuqin^{3,4}

1. Department of Clinical Pharmacology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

2. Hunan Key Laboratory of Pharmacogenetics, Changsha 410078, China

3. Zhejiang Bioasia Life Science Institute, Pinghu 314200, China

4. Zhejiang Bioasia Pharmaceutical Co., Ltd., Pinghu 314200, China

Abstract: Objective To evaluate the toxicological safety of *Isaria cicadae* synnemata (ICS). **Methods** The acute toxicity test, genotoxicity test (chromosome aberration of Chinese hamster lung fibroblast cells, micronucleus test of bone marrow cell in mice and Ames test) and teratogenicity test were employed for toxicological research and evaluation of ICS. **Results** Acute toxicity test showed that the acute oral maximum tolerated doses (MTD) of ICS to male and female rats were both more than 10 g/kg, indicating that ICS was non-toxicity. The results of genotoxicity tests, including chromosome aberration of Chinese hamster lung fibroblast cells, bone marrow cell micronucleus test, and Ames test, were all negative without mutations. In addition, no obvious adverse effect was observed on the weight, stillbirth rate, fetus rate, weight of fetal rats, the length of the fetus, the width of the anterior tibia, the appearance, visceral development and skeletal development of the fetuses. **Conclusion** ICS is a non-toxic substance without acute toxicity, genetic toxicity and teratogenic effect on pregnant rats.

Key words: *Isaria cicadae* synnemata (ICS); acute toxicity test; genotoxicity test; teratogenicity test

收稿日期: 2019-12-23

基金项目: 国家星火计划(2015GA700011)

第一作者: 孙长胜(1964—), 男, 博士, 研究方向为药物遗传毒性研究。Tel: 13311853916 E-mail: dauidsun@bioasia.com.cn

*通信作者: 周宏灏, 中国工程院院士, 研究方向为遗传药理学和临床药理学。E-mail: hhzhou2003@163.com

王玉芹(1971—), 博士, 研究方向为中药开发。Tel: 13381982112 E-mail: wyq@bioasia.com.cn

蝉花是虫草科真菌蝉棒束孢菌 *Isaria cicadae* Miquel(也称蝉拟青霉)的孢梗束、大蝉草的子座及共同寄生的虫体,为传统名贵中药材,《本草纲目》记载其性味甘、寒,无毒,入肺、肝经,具有散风热、明目、退翳、透疹等功效,主治小儿天吊、心悸、夜啼等症。现代研究表明蝉花具有明目护眼^[1]、改善肾功能^[2]、调节免疫^[3]、抗肿瘤^[4]、镇静解热^[5]、降血糖^[6]、抗辐射^[7]等广泛的药理作用。蝉花孢梗束是经人工培养所得的孢梗束,其化学成分与天然蝉花相似^[8]。作为一种新的食用和药用资源,其医疗保健价值日益受到关注,开发前景广阔,但同时其安全性也越来越受到社会重视,目前尚未见关于蝉花孢梗束毒性研究的报道。本文对人工培养蝉花孢梗束对大鼠的急性经口毒性、遗传毒性、母体、胚胎毒性及致畸方面的潜在影响进行了实验研究,以明确蝉花孢梗束的安全性,为其在医疗、保健方面的应用提供参考。

1 材料

1.1 主要材料和试剂

蝉花孢梗束,采用蝉花菌 *Isaria cicadae* Miquel 经小麦等粮食培养基固态发酵培养而得的孢梗束(ICS),菌种由浙江泛亚生物医药股份有限公司提供,经中国科学院微生物研究所郭英兰教授鉴定为蝉花 *I. cicadae* Miquel。

中国仓鼠肺(CHL)细胞株购自上海细胞库;丝裂霉素 C,浙江海正药业有限公司产品,批号 101203;环磷酰胺,江苏恒瑞医药股份有限公司产品,批号 10121021;大鼠肝脏肝微粒体酶(S9),Xeno Tech. LLC 公司产品,批号 1010120;叠氮钠(NaN_3),Johnson Matthey-Alfa 公司产品,批号 10152698;甲基磺酸甲酯,Sigma-Aldrich Aesar 公司产品,批号 MKBG0368V;2-氨基苄, Sigma-Aldrich Aesar 公司产品,批号 S41322;敌克松, Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司产品,批号 70321;维生素 A, Sigma 公司产品,批号 BCBC0596V。

1.2 鼠伤寒沙门氏菌菌株

鼠伤寒沙门氏菌菌株 TA97a、批号 4584D,菌株 TA98、批号 4599D,菌株 TA100、批号 4600D,菌株 TA102、批号 4604D,菌株 TA1535、批号 4602D,均购自于 Molttox, Molecular Toxicology, INC. 公司。

1.3 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 24 只,体质量 160~180 g,雌雄各半,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2012-0001;实验动

物质量合格证号 11400700194208;SPF 级 Wistar 大鼠 150 只由湖北省实验动物研究中心提供,实验动物生产许可证号 SCXK(鄂)2008-0005,实验动物使用许可证号:SYXK(鄂)2012-0065。

ICR 小鼠 35 只,购自上海西普尔必凯实验动物有限责任公司。动物合格证号:2008001622313,生产许可证号码 SCXK(沪):SCXK(沪)2008-0016。

2 方法

2.1 SD 大鼠单次 ig 蝉花孢梗束的急性毒性

本研究共使用 20 只 SD 大鼠,雌雄各半,检疫 7 d,进行体质量测定和临床症状观察。检疫期结束后,随机分为 2 组,各 10 只、雌雄各半,分别为溶媒对照组、蝉花组(给予 12 g/kg),给药体积均为 20 mL/kg。首次给药后连续观察动物的姿势、步态、反应状态、神经活动、食欲、被毛、眼睛、耳、口、鼻、四肢、呼吸、粪便等临床症状,最长至给药后 6 h。随后继续观察 14 d,观察动物的临床症状、活动等。第 15 d 对全部动物进行大体病理学检查。

2.2 CHL 细胞体外染色体畸变试验

选择 CHL 细胞作为试验细胞株,同时设加代谢活化系统(+S9)和不加代谢活化系统(-S9)组。根据预实验结果,确定蝉花孢梗束剂量(终浓度)为 0.058、0.029、0.0145 mg/mL,同时设溶剂对照组(去离子水)和阳性对照组(-S9 用丝裂霉素 C 0.000 5 mg/mL,+S9 用环磷酰胺 0.04 mg/mL),每组设 2 瓶细胞作为平行对照。给药后分别在 24、48 h 收集细胞并制片。每组观察 200 个细胞中期分裂相内的染色体畸变数,计算染色体畸变率。

染色体畸变率=结构性染色体畸变总数/分析总细胞数

2.3 哺乳动物体内骨髓微核试验

ICR 小鼠按体质量通过简单随机化方式分为 5 组,每组 10 只,雌雄各半。给药前禁食不禁水过夜,受试物分别按 1.5、3、6 g/kg 剂量对所有给药组动物进行给药。第 1 组作为对照组接受空白溶剂(去离子水)。第 5 组作为阳性对照组接受剂量为 0.04 g/kg 的环磷酰胺。受试物或溶剂按 20 mL/kg 的给药体积单次给动物 ig,环磷酰胺按 10 mL/kg 的给药体积给动物单次 ip。对所有动物每天进行 2 次笼边观察,以确定其是否有发病,死亡,损害等状况出现,以及供食和供水是否充足。实验期间所有动物给药当天在给药后 30 min 和给药后 4 h 时进行 1 次详细观察,实验期间每天上下午各进行 1 次详细观察;动物在给药当天称体质量并记录;按实验计划对所有存活的动物在给药 24 h 后实施安乐死并解剖,取

两侧股骨骨髓进行骨髓涂片,经固定、染色和封片后进行阅片检查。观察每只动物骨髓中嗜多染红细胞(PCE)/正染红细胞(NCE)的比值。每只动物至少计数2 000个PCE细胞。

2.4 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验

选择鼠伤寒沙门氏菌 TA97a、TA98、TA100、TA102、TA1535 作为试验菌株,并设置药物剂量组:320、160、80、40、20 $\mu\text{g}/\text{皿}$,每个剂量组设3个平皿作为平行对照。每个菌株均设加代谢活化系统(+S9)和不加代谢活化系统(-S9)两组。另外设溶剂对照组(去离子水)、空白对照组(去离子水)和阳性对照组。给药1次,给药后菌株培养72 h后记录各组菌株的回变数,并进行重复试验,以确定试药的致突变性。

阳性对照药及剂量:+S9系统中,TA97a、TA98、TA100组阳性对照为20 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 2-氨基芴,TA102组为200 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 2-氨基芴,TA1535组为200 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 的环磷酸酰胺;-S9系统中,TA97a、TA98组的阳性对照为100 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 敌克松,TA100、TA102组为1 $\mu\text{L}/\text{皿}$ 甲基磺酸甲酯,TA1535组阳性对照为2 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 叠氮钠。

2.5 孕鼠致畸研究

体质量250~300 g雌性Wistar大鼠90只和350~400 g Wistar雄性大鼠45只,按雌雄2:1同笼交配,次日晨阴道涂片检查雌鼠,发现精子确定为受孕0 d;如果5 d内未交配,则更换雄鼠。给药组设高(3.40 g/kg)、中(1.70 g/kg)、低(0.85 g/kg)3个剂量组,同时设阴性对照组、阳性对照组。每天查出的交配雌鼠按体质量随机分到给各组,并称质量、编号、单笼饲养,在受孕的第7~16天ig给予受试物,连续共10 d。阳性对照组给予维生素A(0.013 g/kg),阴性对照组给予等量蒸馏水。并分别在受孕第0、7、12、16、20天称孕鼠体质量,妊娠第20天用3%戊巴比妥钠麻醉后剖腹取出子宫称质量;剖开子宫观察胎鼠状况,记录总着床数,计算受孕率(受孕率=受孕数/精子数),活胎、死胎和吸收胎数;逐一检查胎鼠有无畸形,如脑膨出、露脑、小头、小耳、眼小、

唇裂、短肢、多趾、多肋、骨化不全等;然后测量体长(身长+尾长)、体质量;再将每窝胎鼠的1/2置于Bouin氏液中固定,2周后切片检查内脏是否有畸形;另1/2胎鼠剥皮去内脏和脂肪,经茜素红溶液染色,透明后检查骨骼是否有畸形。

2.6 统计处理

实验数据用Microsoft Excel软件建立数据库,结合SPSS 16.0软件进行数据分析。胎鼠身长、体质量、平均活胎数、子宫连胎重等采用 t 检验,孕鼠质量增加采用方差分析或非参数统计法。胎鼠数据以窝为单位进行统计。

3 结果

3.1 SD大鼠单次ig蝉花孢梗束急性毒性

在整个实验期间,溶媒对照组和蝉花孢梗束组动物均未见异常临床症状,溶媒对照组和蝉花孢梗束组动物体质量增长未见明显异常,对所有大鼠在实验期结束后进行大体剖检,未见与给予供试品相关的脏器大体病理学改变。SD大鼠最大给药量为12 g/kg,按体质量比该剂量相当于临床剂量的480倍,按体表面积比相当于临床剂量的99倍,按急性毒性剂量分级标准属实际无毒级。

3.2 CHL细胞体外染色体畸变试验

蝉花孢梗束对24 h体外培养CHL细胞的染色体畸变试验结果见表1、2,对84 h体外培养CHL细胞的染色体畸变试验结果见表3、4。结果显示在有和无代谢活化系统条件下,供试品各剂量组分别作用24、48 h所诱发的染色体畸变数均低于5%,其畸变率与溶媒对照组相比均无显著性差异($P>0.05$),且未呈现量-效关系。阳性对照组能够诱发受试细胞染色体畸变,在有或无代谢活化系统条件下能使CHL细胞染色体畸变率明显升高(畸变率均 $>5\%$)。

3.3 哺乳动物体内骨髓微核试验

供试品对小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验及其PCE/NCE值结果显示,蝉花孢梗束给药组微核诱发率与溶剂对照组相比均无统计学差异(雌性雄性

表1 蝉花孢梗束对24 h体外培养CHL细胞的染色体畸变试验结果(+S9)

Table1 Results of *Isaria cicadae* synnemata on chromosomal aberrations of CHL cells cultured for 24 hours *in vitro* (+S9)

组别	剂量/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	各类型染色体畸变数/个					染色体畸变总数/个	染色体畸变率/%
		断裂	缺失	交换	环状	多倍体		
溶剂对照	—	0	0	0	1	0	1	0.5
阳性对照	0.04	2	1	0	5	0	15	7.5
ICS	0.014 5	0	0	0	3	0	4	2.0
	0.029	0	0	0	2	1	3	1.5
	0.058	0	1	0	2	0	3	1.5

表2 蝉花孢梗束对24 h体外培养CHL细胞的染色体畸变试验结果(-S9)

Table 2 Results of *Isaria cicadae* synnemata on chromosomal aberrations of CHL cells cultured for 24 hours *in vitro*(-S9)

组别	剂量/(mg·L ⁻¹)	各类型染色体畸变数/个					染色体畸变总数/个	染色体畸变率/%
		断裂	缺失	交换	环状	多倍体		
溶剂对照	—	0	0	0	1	1	2	1.0
阳性对照	0.000 5	2	0	0	7	1	18	9.0
ICS	0.014 5	0	0	0	2	0	3	1.5
	0.029	0	0	0	2	1	3	1.5
	0.058	0	0	0	2	0	4	2.0

表3 蝉花孢梗束对48 h体外培养CHL细胞的染色体畸变试验结果(+S9)

Table 3 Results of *Isaria cicadae* synnemata on chromosomal aberrations of CHL cells cultured for 48 hours *in vitro*(+S9)

组别	剂量/(mg·L ⁻¹)	各类型染色体畸变数/个					染色体畸变总数/个	染色体畸变率/%
		断裂	缺失	交换	环状	多倍体		
溶剂对照	—	0	0	0	1	0	1	0.5
阳性对照	0.000 5	4	0	0	4	0	19	9.5
ICS	0.014 5	0	0	0	2	1	5	2.5
	0.029	1	0	0	0	0	3	1.5
	0.058	0	0	0	3	0	4	2.0

表4 蝉花孢梗束对48 h体外培养CHL细胞的染色体畸变试验结果(-S9)

Table 4 Results of *Isaria cicadae* synnemata on chromosomal aberrations of CHL cells cultured for 48 hours *in vitro*(-S9)

组别	剂量/(mg·L ⁻¹)	各类型染色体畸变数/个					染色体畸变总数/个	染色体畸变率/%
		断裂	缺失	交换	环状	多倍体		
溶剂对照	—	0	0	0	1	0	1	0.5
阳性对照	0.000 5	4	0	0	4	0	19	9.5
ICS	0.014 5	0	0	0	2	1	5	2.5
	0.029	1	0	0	0	0	3	1.5
	0.058	0	0	0	3	0	4	2.0

动物进行分别统计, $P > 0.05$); 阳性对照组微核诱发率与溶剂对照组相比有统计学差异(雌性雄性动物进行分别统计, $P < 0.01$), 见表5。根据以上结果判断本试验结果为阴性, 即在本试验条件下蝉花孢梗束不会损害小鼠成红细胞染色体或有丝分裂, 诱导小鼠红细胞微核的形成, 即未显示使小鼠骨髓PCE微核率上升的致突变效应。

3.4 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验

溶剂对照组菌株回变数未超过空白对照组菌株回变数的2倍, 无明显差异, 各剂量组菌株回变数均未超过溶剂对照组菌株回变数的2倍, 阳性菌株回变数大于空白对照组菌株回变数的2倍。蝉花孢梗束剂量为320、160、80、40、20 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 时对鼠伤寒沙门氏菌 TA97a、TA98、TA100、TA102、TA1535 菌株直接作用或经代谢活化均不引起自发回变数增加, 未呈现致突变性。

3.5 致畸试验

3.5.1 对孕鼠一般状况及体质量的影响 试验期间, 各组大鼠一般状况良好, 未见明显的异常症状和体征; 阳性对照组孕期16、20 d体质量及总增重与阴性对照组比较差异有显著性($P < 0.01$), 各剂量组大鼠孕期体质量及总增重与阴性对照组比较, 差异无显著性($P > 0.05$); 结果见表6。

3.5.2 对雌鼠生殖能力的影响 与阴性对照组比较, 阳性对照组受孕率无显著性差异($P > 0.05$); 着床总数、平均着床数、活胎总数、平均活胎数、死胎数、死胎率、吸收胎数、吸收胎率与阴性对照组比较, 均有显著性差异($P < 0.05, 0.01$)。

与阴性对照组比较, 除低剂量组着床总数、平均着床数、活胎总数、平均活胎数有显著性差异($P < 0.05$)外, 中、高剂量组及低剂量组其他指标的差异均无显著性($P > 0.05$)。见表7、表8。

表5 蝉花孢梗束对哺乳动物体内微核试验骨髓涂片阅片结果

Table 5 Results of micronucleus test of *Isaria cicadae* synnemata on mammalian bone marrow smear

组别	受试物	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物数/只	性别	PCE数/个	PCE/NCE	微核数/个	微核率/‰
1	去离子水	—	5	雄	10 458	1.00±0.01	17	1.63±0.30
			5	雌	10 315	1.00±0.01	10	0.97±0.35
2	蝉花孢梗束	1.5	5	雄	10 551	1.00±0.01	22	2.12±1.07
			5	雌	10 338	1.00±0.01	15	1.45±0.49
3	蝉花孢梗束	3	5	雄	10 294	1.00±0.01	14	1.36±0.72
			5	雌	10 374	0.99±0.01	13	1.25±0.99
4	蝉花孢梗束	6	5	雄	10 271	1.00±0.01	16	1.56±0.54
			5	雌	10 262	0.99±0.00	14	1.36±0.22
5	环磷酸胺	0.04	5	雄	10 375	1.00±0.02	170	16.39±1.63*
			5	雌	10 382	1.00±0.01	149	14.36±0.89*

与第1组比较: *P<0.01

*P<0.01 vs group 1

表6 蝉花孢梗束对孕鼠孕期体质量的影响

Table 6 Effect of *Isaria cicadae* synnemata on pregnant rats' body weight

组别	孕鼠数/只	剂量/(g·kg ⁻¹)	孕鼠体质量/g		
			0 d	7 d	12 d
阴性对照	12	—	270.7±10.7	298.4±12.8	322.5±14.2
维生素A	12	0.013	276.2±14.7	306.8±13.9	311.9±21.8
ICS	12	0.85	270.6±15.0	296.0±13.0	322.0±14.8
	14	1.70	274.1±14.0	314.3±37.0	332.4±16.0
	12	3.40	277.8±15.8	304.7±16.7	327.2±21.5

组别	孕鼠数/只	剂量(g·kg ⁻¹)	孕鼠体质量/g		体质量增加总量/g
			16 d	20 d	
阴性对照	12	—	356.4±17.8	424.0±23.2	153.3±19.9
维生素A	12	0.013	329.8±20.4**	349.8±29.2**	103.6±29.7**
ICS	12	0.85	347.6±17.9	411.0±18.9	140.5±22.1
	14	1.70	364.7±19.3	431.1±31.4	157.0±28.5
	12	3.40	353.7±22.2	421.1±25.1	143.3±26.3

与阴性对照组比较: *P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs negative control group

表7 蝉花孢梗束对孕鼠受孕率的影响

Table 7 Effect of *Isaria cicadae* synnemata on conception rate of pregnant mice

组别	涂片精子数/个	受孕数/只	受孕率/%
阴性对照	14	12	85.71
维生素A	15	12	80.00
ICS	15	12	80.00
	15	14	93.33
	15	12	80.00

4 讨论

蝉花作为一种传统的名贵中药材,已有千年的

应用历史,《本草纲目》记载蝉花具有散风热、镇惊、明目的功效,近年来对其药效作用等研究取得很大进展。现代药理学研究表明,蝉花除在作为传统的散风热、镇惊、明目中药外,更兼具改善肾功能、提高免疫力、抗肿瘤、降血糖等多种功能^[14]。为了深入了解蝉花的毒性和食用安全性的状况,本文从急性、遗传性和大鼠胚胎毒性、致畸性等方面对其毒理学的表现进行了研究。

急性毒性试验是用于评价材料短期经口服用后对机体的毒副作用;Ames试验主要是针对生物的基因突变进行评估;骨髓细胞微核试验主要是对染色体结构完整性的变化进行评估;中国仓鼠细胞

表8 蝉花孢梗束对母鼠生殖能力的影响

Table 8 Effect of *Isaria cicadae* synnemata on reproductive ability of female mice

组别	着床总数/ 个	平均着床数/ 个	活胎总数/ 个	平均活胎数/ 个	死胎总数/ 个	吸收胎总数/ 个	死胎率/%	吸收胎率/%
阴性对照	191	15.5±3.5	186	15.9±3.1	0	5	0.00	2.62
维生素A	152*	12.7±3.6*	133**	11.1±3.9**	4**	15**	2.63**	9.87**
ICS	144*	11.3±4.9*	135*	12.0±5.0*	0	9	0.00	6.25
	216	15.4±5.3	204	14.6±5.1	0	12	0.00	5.56
	178	14.8±3.4	166	13.8±3.5	1	11	0.56	6.18

与阴性对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs negative control group

染色体畸变试验所反映的遗传学终点主要是对哺乳动物细胞潜在的致突变性进行评估;致畸试验用于检测妊娠动物接触材料后引起的致畸可能性。

天然蝉花资源短缺,难以大规模开发应用,现主要采用人工培养方式获得子实体(孢梗束)或菌丝体(液体发酵)应用。本研究首次针对人工培养的蝉花孢梗束进行经口急性毒性、三致试验及致畸试验。结果表明,蝉花孢梗束对SD大鼠ig最大给药量为12 g/kg,属于无毒级;蝉花孢梗束体外中国仓鼠肺细胞染色体畸变试验、哺乳动物体内骨髓微核试验和鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验均呈阴性反应,未显示有基因毒性作用;蝉花孢梗束按0.85、1.70、3.40 g/kg剂量对Wistar大鼠妊娠第7~16 d连续给予10 d,未发现对大鼠有明显的母体毒性、胚胎毒性和致畸性,提示蝉花孢梗束对孕鼠无致畸作用。可见人工培养的蝉花孢梗束具有良好的安全性。蝉花(包括菌丝体、孢梗束及野生蝉花)对孕鼠的致畸研究目前尚无报道,本文首次评估了蝉花孢梗束对孕鼠的致畸作用。

关于蝉花的人工培养品,主要有液体发酵的菌丝体和固体发酵培养的孢梗束。蝉花菌丝体的急性毒性和基因毒性相关试验已有文献报道。陈祝安等^[9]使用蝉花菌丝体进行了急性毒性试验,以60 g/kg剂量ig给药,试验动物未见异常;ip给药对小鼠半数致死量(LD₅₀)为(12.5±2.1)g/kg。许胜杰等^[10-13]使用发酵生产的蝉花菌丝体完成了小鼠和大鼠的急性毒性、14 d的仔猪急性毒性试验及基因毒性试验等安全性评估试验,结果与对照组相比蝉花培养物对小鼠和大鼠各项指标均无影响,菌丝体及其水提物、醇提物的LD₅₀分别超过12、12、3 g/kg。在另外1项研究中,将蝉花发酵菌丝体添加于离乳仔猪饲料中,进行14 d的急性及其行为表现评估的试验结果表明,添加蝉花培养物5%于离乳仔猪饲料中,连

续喂食14 d后不会引发仔猪急性毒性现象,对其生长性能表现上并无促进或危害。在基因毒性试验方面,以2.0 g/kg体质量的剂量喂食SD品系大鼠进行体外染色体毒性试验及动物体内微核试验,结果蝉花发酵菌丝体不会使受试小鼠的染色体数目及结构发生改变,也无骨髓抑制作用及对染色体损伤的现象,没有致突变作用。

蝉花液体发酵菌丝体与天然野生蝉花外形上有较大的差异,不容易被消费者接受。人工培养的蝉花孢梗束与野生蝉花生长模式相同,其更接近于野生蝉花。当前对蝉花的利用还是以生药形式(主要为野生、菌丝体、子实体)的初级产品,而市场上其他虫草菌如蝙蝠蛾拟青霉、蛹虫草皆已开发出深加工产品,如虫草胶囊、虫草口服液、虫草酒等,得到广大消费者的青睐。随着蝉花的活性成分与结构、作用机制的不断明确,可以更深入地开发蝉花制品如蝉花胶囊、蝉花保健酒等来满足市场的需求,使其良好的药用保健价值真正造福于民。因此,对其安全性的研究将为蝉花孢梗束食品及保健食品,乃至药品的开发及利用提供有力支撑。不过,目前蝉花人工子实体(孢梗束)栽培技术仍不完善,还须深入研究其形成机制,掌握其生长规律,加快实现蝉花孢梗束规模化、标准化生产技术的突破。

参考文献

[1] 徐大梅. 万应蝉花散治疗春季结膜炎100例临床观察[J]. 中国中医眼科杂志, 2010, 20(3): 172-173.
 [2] Zhu R, Chen Y P, Deng Y Y, et al. *Cordyceps cicadae* extracts ameliorate renal malfunction in a remnant kidney model [J]. Zhejiang Univ Sci B, 2011, 12(12): 1024-1033.
 [3] Weng S C, Chou C J, Lin L C, et al. Immunomodulatory functions of extracts from the Chinese medicinal fungus *Cordyceps cicadae* [J]. J Ethnopharmacol, 2002, 83(1/2) :

- 79-85.
- [4] Ukai S, Kiho T, Hara C, et al. Polysaccharides in Fungi XIII. Antitumor activity of various polysaccharides isolated from *Dictyophora indusiata*, *Ganoderma japonicum*, *Cordyceps cicadae*, *Auricularia auricula-judae* and *Auricularia* species [J]. Chem Pharm Bull, 1983, 31(2): 741-744.
- [5] 王海颖, 陈以平. 陈以平教授巧用蝉花经验 [J]. 中国中医药信息杂志, 2000, 7(10): 71.
- [6] 陈万群, 陈古荣. 冬虫夏草代用品研究进展 [J]. 中草药, 1994, 25(5): 269-271.
- [7] 王 砚, 赵小京, 唐法娣. 蝉花药理作用的初步探讨 [J]. 浙江中医杂志, 2001, 36(5): 219-220.
- [8] 张红霞, 高新华, 陈 伟, 等. 人工培育蝉花与天然蝉花中化学成分的比较 [J]. 食用菌学报, 2012, 19(3): 59-62.
- [9] 陈祝安, 刘广玉, 胡焱英. 蝉花的人工培养及其药理作用研究 [J]. 真菌学报, 1993, 12(2): 138-144.
- [10] 许胜杰, 叶淑幸, 陈劲初. 新资源食品蝉花菌丝体的开发 [J]. 食药菌, 2011, 19(6): 34-37.
- [11] Lin M Y, Hsu J H, Wu J J, et al. A acute toxicity study of *Cordyceps cicadae* Mycelium in ICR mice and SD rats [J]. Hans J Food Nutr Sci, 2017, 6(2): 96-105.
- [12] Jhou B Y, Hsu J H, Yeh S H, et al. A subacute toxicity study of *Cordyceps cicadae* Mycelium in high-glucose diet-fed LY pigs [J]. Hans J Food Nutr Sci, 2016, 5(2): 13-20.
- [13] 徐瑞霞, 叶淑幸, 黄维茜, 等. 大蝉花菌种分离、鉴定及其液态培养菌丝体之基因毒性评估 [J]. 检验及品保杂志, 2015(4): 114-127.
- [14] 蒋 宁, 高大伟, 林金盛, 等. 蝉花的研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45(8): 11-14.