预防非典型肺炎方剂对小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤的影响

金顺姬,段 链,黄 梅,杨静玉,于 海,吴春福*

(沈阳药科大学 药理教研室,辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 研究预防非典型肺炎方剂对小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 的损伤作用。方法 应用单细胞凝胶电泳方法测定 6 个预防非典型肺炎方剂体内给药对小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤的作用。结果 ig 给予预防非典型肺炎方剂 I、V、VI (1/3 临床等效剂量、临床等效剂量、3 倍临床等效剂量× 3 d) 对小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 有明显的损伤作用,并呈剂量依赖关系。预防非典型肺炎方剂 II、III、IV (1/3 临床等效剂量、临床等效剂量、3 倍临床等效剂量× 3 d) 对小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 没有明显的损伤作用。结论 预防非典型肺炎方剂 I、V、VI 具有潜在的遗传毒性。

关键词: 预防非典型肺炎方剂; DNA 损伤; 单细胞凝胶电泳

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2003)08-0733-03

Effect of Chinese materia medica prescriptions against SARS on lymphocyte DNA damage in mice

JIN Shun-ji, DUAN Lian, HUANG Mei, YANG Jing-Yu, YU Hai, WU Chun-fu

(Department of Pharmacology, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract Object To evaluate the genotoxicity of the prescriptions against severe acute respiratory syndrome (SARS) in mice lymphocytes DNA damage in mice. **Methods** Six prescriptions were ig administered to the mice for 3 days. The DNA damage was measured in mice lymphocytes by means of single cell gel electrophoresis assay (SCGE, or comet assay). **Results** Lymphocyte DNA damage was distinctly observed by administration of the prescriptions I, V and VI for 3 days at the doses of 1/3 to 3 times of the clinically equivalent dosage. There was no significant DNA damage by administration of the prescriptions II, III and IV for 3 days. **Conclusion** The prescriptions I, V and VI possess potential genotoxicity.

Key words prescriptions against SARS; DNA damage; single-cell gel electrophoresis (SCGE)

长期以来,人们认为中药的毒副作用较少甚至没有,从而造成了对中药的应用剂量、疗程乃至适应人群不加严格区分的局面。近年来由中药造成的中毒甚至致死事件屡有报道。由冠状病毒引起的非典型肺炎目前尚无特效治疗药物。为预防非典型肺炎在社会上进一步流行,经国家卫生部非典型肺炎防治领导小组审定,国家中医药管理局向社会推荐了 6 个预防非典型肺炎的中药方剂。这些方剂在社会上得到了较广泛的应用。尽管这些处方根据辨证分别适用于不同体质的人群,但主要还是用于健康人群预防非典型肺炎的感染。6 个方剂主要以清热解毒药为主。然而,这些中药的安全性如何,是否适合长期服用? 这些问题无论是在非典型肺炎的紧急时期还是在平时的使用中都需要有一个科学地回答。因此,本实验应用国际公认的可测定药物遗传毒性的单细胞凝胶电泳技术 (single cell gel elec-

trophoresis assay, SCGE), 又称慧星试验 (comet assay), 测定了 6 个抗非典方剂体内给药对小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 的损伤作用,以期从一个侧面评价方剂的安全性。

1 材料

1.1 方剂组成与煎煮方法: 方剂 I: 生黄芪 10 g 败酱草 15 g 薏苡仁 15 g 桔梗 6 g 生甘草 3 g 方剂 II: 鱼腥草 15 g 野菊花 6 g 茵陈 15 g 佩兰 10 g 草果 3 g 方剂 III: 蒲公英 15 g 金莲花 6 g 大青叶 10 g 葛根 10 g 苏叶 6 g 方剂 IV: 芦根 15 g 金银花 10 g 连翘 10 g 薄荷 6 g 生甘草 5 g 方剂 V: 生黄芪 10 g 白术 6 g 防风 10 g 苍术 6 g 藿香 10 g 沙参 10 g 金银花 10 g 贯众 6 g 方剂 VI: 太子参 15 g 贯众 6 g 金银花 10 g 连翘 10 g 大青叶 10 g 苏叶 6 g 葛根 10 g 藿香 10 g 苍术 6 g 佩兰 10 g 上述中药饮片均购自沈阳市药材公司。药材的

* 收稿日期: 2003-06-11

作者简介: 金顺姬 (1975-), 女, 吉林人, 沈阳药科大学药理学硕士, 主要从事中药药理学研究

* 通讯作者 Tel Fax: (024) 23843567 E-mail: wucf@sphu.edu.cn

E-mail: dearjjs0504@sina.com

植物基源由沈阳药科大学药用植物教研室孙启时教授鉴定(表 1)。按照卫生部防治非典型肺炎领导小组公布的方法将上述方剂用水煎煮、浓缩至 3 倍临床等效量,临用前用生理盐水稀释至所需浓度。其中组方中的薄荷、藿香、苏叶在药液沸腾后加入共煎

表 1 预防非典型肺炎方剂所用中药的原植物

Table 1 Scientific names of herbs used in prescriptions against SARS

名称	原植物拉丁名称
黄芪	<i>Astragalus membranaceus</i> (Fisch.) Bunge
败酱草	<i>Sonchus brachyotus</i> DC.
薏苡仁	<i>Coix lacryma-jobi</i> L. var. <i>ma-yuen</i> (Roman.) Stapf.
桔梗	<i>Platycodon grandiflorum</i> (Jacq.) A. DC.
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.
鱼腥草	<i>Houtuyinia cordata</i> Thunb.
野菊花	<i>Chrysanthemum indicum</i> L.
茵陈蒿	<i>Artemisia capillaris</i> Thunb.
佩兰	<i>Eupatorium fortunei</i> Turcz.
草果	<i>Amomum tsao-ko</i> Crevost et Lemaire
蒲公英	<i>Taraxacum mongolicum</i> Hand. -Mazz.
金莲花	<i>Trollius chinensis</i> Bunge
大青叶	<i>Isatis indigotica</i> Fortune
苏叶	<i>Perilla frutescens</i> (L.) Britt
芦根	<i>Phragmites communis</i> Trin.
金银花	<i>Lonicera japonica</i> Thunb.
连翘	<i>Forsythia suspensa</i> (Thunb.) Vahl
薄荷	<i>Mentha haplocalyx</i> Briq.
白术	<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidz.
防风	<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Tuecz.) Schischk
苍术	<i>Atractylodes lancea</i> (Thunb.) DC.
藿香	<i>Agastache rugosa</i> (Fisch. et Mey.) O. Ktze
北沙参	<i>Glehnia littoralis</i> Fr. Schmidt ex Miq.
贯众	<i>Dryopteris crassirhizoma</i> Nakai
太子参	<i>Pseudotellaria heterophylla</i> (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm.
粉葛	<i>Pueraria thomsonii</i> Benth.

1.2 主要试剂:淋巴细胞分离液(991103)购于上海恒信化学试剂有限公司;低熔点琼脂糖(BI0153)、正常熔点琼脂糖(051363)、溴化乙啶(BS0606)均购于华美生物工程公司。

1.3 主要器材: DYY-6B 型稳压稳流电泳仪、DY-CP-38B 型水平电泳槽(北京市六一仪器厂)、VANOX 型 OLYMPUS 荧光显微镜(日本)、150ES 数码摄像头(美国)、LUCIA 彗星实验分析软件系统(捷克)。

表 2 预防非典型肺炎方剂 I 对小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 2 Effect of prescription I against SARS on lymphocyte DNA damage in mice ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量 $l(g \cdot kg^{-1})$	尾 DNA 含量 %	尾长 %	尾矩 %	椭圆矩 %	尾面积 %
NS	-	100.00 $\pm$ 8.64	100.00 $\pm$ 8.01	100.00 $\pm$ 14.21	100.00 $\pm$ 8.22	100.00 $\pm$ 8.93
I	2.2	232.94 $\pm$ 9.68*	435.26 $\pm$ 22.77**	940.54 $\pm$ 48.14**	389.55 $\pm$ 18.46**	393.42 $\pm$ 26.53*
I	6.5	365.48 $\pm$ 41.43*	491.12 $\pm$ 28.95**	1 683.78 $\pm$ 206.18**	629.85 $\pm$ 52.75**	621.06 $\pm$ 60.64*
I	19.6	383.73 $\pm$ 9.64*	627.71 $\pm$ 39.02*	2 256.76 $\pm$ 45.09**	711.94 $\pm$ 45.16**	704.94 $\pm$ 33.86*

与 NS 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ (表 3 和表 4 同)

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs NS group (Table 3 and Table 4 are the same)

1.4 动物:昆明种小鼠,雄性,体重 18~22 g,由沈阳药科大学实验动物中心提供,动物合格证号:辽实合字 047 号。

2 方法

2.1 给药方案:小鼠分为生理盐水(NS)组及给药组,每组 4 只。给药组分别 ig 方剂高、中、低(3 倍临床等效量、临床等效量、1/3 临床等效量)剂量,以 g(生药)/kg 表示。NS 组 ig 等量 NS,连续 ig 3 d

2.2 单细胞凝胶电泳实验^[1,2]:参照文献方法加以改进,末次给药后 1 h 小鼠经眼眶取血,分离外周血液淋巴细胞,制片,裂解 2 h,解旋 40 min,电泳 30 min,中和染色,阅片。每个样本随机观察 40 个细胞,使用 LUCIA 软件分析。

2.3 统计学处理:以 NS 组的各测定指标为 100%,计算给药组各指标的变化百分率。实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用两因素方差分析(ANOVA)判断总体显著性差异,组间资料采用 Fisher's least-significant difference (LSD) 分析统计学差异。

3 结果

3.1 方剂 I、V、VI 对小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤的影响:见表 2、3 和 4。结果表明,抗非典方剂 I、V、VI 给药 3 d 后,小鼠外周血液淋巴细胞尾 DNA 含量、尾长、尾矩、椭圆矩以及尾面积与 NS 组相比差异均有显著性,并呈一定的量效关系。提示 I、V、VI 方剂对小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 有明显的损伤作用。

3.2 方剂 II、III、IV 对小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤的影响:实验结果表明,方剂 II、III、IV 给药 3 d 对小鼠外周血液淋巴细胞的影响与 NS 相比差异没有显著性,提示这 3 个方剂对 DNA 没有损伤作用。

4 讨论

单细胞凝胶电泳技术是一种能够敏感地测定药物早期遗传毒性的方法。由于 DNA 损伤的细胞在电泳后呈现彗星状形态,此方法又被称为“彗星试验”。细胞 DNA 在电泳中移动的程度直接反映

表 3 预防非典型肺炎方剂V 对小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 3 Effect of prescription V against SARS on lymphocyte DNA damage in mice ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量 / (g · kg ⁻¹)	尾 DNA 含量 %	尾长 %	尾矩 %	椭圆矩 %	尾面积 %
NS	-	100.00 ± 5.27	100.00 ± 2.22	100.00 ± 5.98	100.00 ± 3.18	100.00 ± 11.62
V	3.0	184.22 ± 23.68*	126.03 ± 4.73*	224.33 ± 32.19*	185.5 ± 25.79	159.0 ± 11.76
V	9.1	210.63 ± 23.26**	129.45 ± 4.85*	259.90 ± 26.62*	217.33 ± 31.80	184.53 ± 22.90
V	27.2	326.4 ± 58.26*	130.30 ± 6.07*	404.73 ± 76.99*	353.4 ± 63.10*	281.65 ± 47.12*

表 4 预防非典型肺炎方剂VI 对小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 4 Effect of prescription VI against SARS on lymphocyte DNA damage in mice ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量 / (g · kg ⁻¹)	尾 DNA 含量 %	尾长 %	尾矩 %	椭圆矩 %	尾面积 %
NS	-	100.00 ± 17.75	100.00 ± 4.41	100.00 ± 12.34	100.00 ± 7.24	100.00 ± 8.33
VI	4.1	147.18 ± 18.72*	137.98 ± 14.39	178.80 ± 11.73*	164.4 ± 23.69	125.9 ± 13.40
VI	12.4	168.35 ± 14.68*	183.87 ± 5.05**	268.40 ± 28.45*	196.6 ± 25.40	156.1 ± 14.91
VI	37.2	247.00 ± 9.50**	207.07 ± 3.53**	443.20 ± 9.76**	249.15 ± 3.73**	197.22 ± 7.37**

DNA 分子损伤的程度。应用哺乳动物细胞进行的众多的体内和体外试验已证明了这种方法的可信性^[3]。应用此方法,本实验结果表明,抗非典方剂II, III和IV 给药 3d,对小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 均无明显损伤;而方剂 I, V 和VI在 1/3 的临床等效量就有明显的致淋巴细胞 DNA 损伤的作用,提示 6 个方剂中,方剂 I, V, VI 具有较明显的遗传毒性。

综合 6 个方剂的主要功能,主要以清热、解毒、化湿、益气为主。方剂中大多含有具有抑制微生物如细菌或病毒活性的中药,金银花、贯众、苍术、藿香、大青叶、连翘和佩兰等。由于病毒是一种需要特定生活条件的细胞内寄生物,完全依赖于宿主细胞的代谢作用作为自身复制的条件,故有些抗病毒药物,在阻断病毒复制的同时,可能对细胞本身也有损伤作用。然而,这并不能说明抗菌抗病毒药物不可避免地要对宿主细胞 DNA 产生毒性,应用同样的方法研究表明,有些抗病毒药物并不引起 DNA 损伤^[4,5]。方剂II, III和IV 也含有一些具有抑菌和抗病毒作用的中药,但在本研究中没有表现对 DNA 的损伤作用,说明除了单味药物的作用外,药物间配伍不同所表现的方剂毒性也不同。

总之,本研究结果表明,无论方剂 I, V 和VI是

否能够预防非典型肺炎,但它们对细胞 DNA 具有明显的损伤作用,提示具有潜在的遗传毒性。本实验结果也提示,对健康人服用中药来预防非典型肺炎应持慎重态度。尤其是老年人、儿童及体弱、抵抗力低下者,要合理科学的用药,决不能盲目地长期大量服用中药。

致谢:王大方、吴波峰、贾景明等参加本研究部分工作。

References

- [1] Sasaki Y F, Nishidate E, Izumiyama F, et al. Simple detection of chemical mutagens by the alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) [J]. *Mutat Res*, 1997, 391: 215-231.
- [2] An W L, Li L, Piao J H, et al. Analysis of H₂O₂-induced peripheral lymphocyte DNA damage in rats by single-cell gel electrophoresis [J]. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志), 2002, 5(20): 296-299.
- [3] McKelvey-Martin V J, Green M H L, Schmezer P, et al. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review [J]. *Mutat Res*, 1993, 288: 47-63.
- [4] Placidi L, De Meo M, Gosselin G, et al. Evaluation of the mutagenic and genotoxic activities of anti-hepatitis B analogs of beta-L-adenosine by the Ames test and the comet assay [J]. *Antiviral Res*, 2001, 50: 139-145.
- [5] Barnard D L, Fairbairn D W, O'Neill K L, et al. Anti-human cytomegalovirus activity and toxicity of sulfonated anthraquinones and anthraquinone derivatives [J]. *Antiviral Res*, 1995, 28: 317-329.