

吴茱萸及其主要成分的遗传毒性研究

夏祺悦^{1,2} 刘燕萍¹ 杨润芳¹ 刘强强¹ 卓衍菁¹ 李宏霞¹

(1 四川大学华西医院国家成都中药安全性评价中心,成都,610041; 2 四川省医学科学院四川省人民医院实验动物研究所,成都,610212)

摘要 目的:研究吴茱萸及其主要成分吴茱萸碱、吴茱萸次碱和柠檬苦素的遗传毒性,为有毒中药吴茱萸的开发利用提供依据。方法:选用了 Ames 试验、体外 CHL 细胞染色体畸变试验和小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验。Ames 试验选用 TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535 组氨酸缺陷型菌株。吴茱萸碱、吴茱萸次碱和柠檬苦素分别设 5 个剂量组:0.000 5、0.005、0.05、0.5、5 mg/皿;体外 CHL 细胞染色体畸变试验,吴茱萸碱、吴茱萸次碱和柠檬苦素的剂量分别为 0.005 mg/mL、0.05 mg/mL 和 0.5 mg/mL,受试药物与 CHL 细胞接触时间分别为 4 h 和 24 h;吴茱萸醇提物小鼠骨髓微核试验,设吴茱萸醇提物 0.88、3.52、10.55 g(生药)/kg 3 个给药剂量组。连续给药 4 d,每天给药 1 次。结果:吴茱萸碱、吴茱萸次碱和柠檬苦素各剂量组 Ames 试验结果为阴性。CHL 试验中,吴茱萸碱的试验结果为阴性;吴茱萸次碱 24 h 组细胞染色体畸变率略有增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);柠檬苦素 4 h 和 24 h 组细胞染色体畸变率都略有增加,0.05 mg/mL、0.5 mg/mL 组与阴性对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 0.005 mg/mL 组与阴性对照比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。微核试验中,吴茱萸醇提物的小鼠骨髓细胞微核试验结果为阴性。结论:综合以上 3 个试验结果,认为在本实验室条件下,吴茱萸醇提物无遗传毒性。但在体外试验中,吴茱萸次碱和柠檬苦素有致突变性。为进一步确认吴茱萸及其主要成分的遗传毒性,可进一步研究和探讨。

关键词 吴茱萸;遗传毒性;小鼠骨髓微核试验;Ames 试验;染色体畸变试验

Studies on the Genetic Toxicity of Evodia Rutaecarpa and its Main Components

Xia Qiyue^{1,2}, Liu Yanping¹, Yang Runfang¹, Liu Qiangqiang¹, Li Hongxia¹

(1 National Center for Safety Evaluation of Traditional Chinese medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2 Institution of Laboratory Animal, Sichuan Provincial People's Hospital, Sichuan Academy of Medical Sciences, Chengdu 610212, China)

Abstract Objective: To investigate the genetic toxicity of evodia rutaecarpa and its main components, including evodiamine, rutaecarpin and limonin, in order to provide useful data for developing toxic Traditional Chinese Medicine. **Methods:** Ames test, CHL chromosome aberration assay and micronucleus assay of bone marrow cell in mice were used to test evodiamine, rutaecarpin, limonin and evodia rutaecarpa. Strains TA97, TA98, TA100, TA102 and TA1535 were used in the Ames test. There were five dose groups respectively for evodiamine, rutaecarpin and limonin as follows: 0.0005, 0.005 mg/plate, 0.05 mg/plate, 0.5 mg/plate, 5 mg/plate. As a result, the results of the Ames assay were negative for various groups of evodiamine, rutaecarpin and limonin. In CHL chromosome aberration assay, the doses of evodiamine, rutaecarpin and limonin were 0.005 mg/mL, 0.05 mg/mL and 0.5 mg/mL respectively. Exposure time were 4 h and 24 h. **Results:** The result of the Evodiamine was negative. Aberration rate of 24 h exposure Rutaecarpin chromosome increased significantly compared with that of negative control group ($P < 0.05$). Aberration rate of Limonin chromosome 0.05 and 0.5 mg/ml groups increased in 4 h and 24 h exposure compared with negative control group ($P < 0.05$), the 0.005 mg/mL group was not significantly different compared with negative control group ($P > 0.05$). In vivo micronucleus test with evodia rutaecarpa alcohol extract, there were 3 dosing groups: 0.88, 3.52, 10.55 g raw drug/kg, 4 days, once every day. The results was negative. **Conclusion:** no genetic toxicity was observed in evodia rutaecarpa alcohol extract. However, rutaecarpin and limonin shows some genotoxicity in vivo test, which requires further research to confirm.

Key Words Evodia rutaecarpa; Genotoxicity; Micronuclei assay; Ames test; Chromosome aberration assay

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2014.02.005

吴茱萸是芸香科植物吴茱萸 (*Evodia. rutaecarpa* (Juss.) Benth.)、疏毛吴茱萸 (*E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *Bodinieri* (Dode) Huang) 或石虎 (*Evodia. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode)

Huang) 的干燥近成熟果实。药典记载其有小毒,古今均有广泛应用。《本草纲目》记载:“咽喉口舌生疮者,以吴茱萸末醋调贴两足心,移夜便愈”^[1]。吴茱萸外用敷贴足心,能引火热下行,具有降火之功^[2]。有研究表

明可用吴茱萸贴敷涌泉穴治疗高血压病^[3]。现代药理学研究发现吴茱萸有明显的镇痛、抗炎、抗癌、抗胃溃疡及强心等作用,其镇痛成分主要为吴茱萸碱、吴茱萸次碱及吴茱萸内酯(即柠檬苦素)等^[4-5],抗炎作用的物质基础有吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素等^[6-8];生物碱与柠檬苦素均具有抑制肿瘤作用,吴茱萸碱具有治疗前列腺癌 DU145 和 PC3^[9],白血病 U937^[10],结肠癌 COLO - 205^[11],耐药乳腺癌 NCI/ADR - RES^[12] 等的作用;吴茱萸次碱是一种选择性的细胞色素氧化酶抑制剂^[13],对人恶性黑色素瘤 A375 - S2、宫颈癌 Hela 细胞、乳腺癌 MCF7、人类急性白血病 THP - 1、小鼠纤维瘤 L929 等 5 种肿瘤细胞系有细胞毒性作用,但作用强度不及吴茱萸碱^[14]。吴茱萸中分离出的柠檬苦素有助于降低胆固醇和抵抗癌症^[15]。另外吴茱萸碱和吴茱萸次碱有强心作用^[16];吴茱萸中分离到的柠檬苦素具有抗衰老,抗应激,抗疲劳,阻断亚硝化反应,增强免疫能力,抗菌、抑菌等作用^[17]。

吴茱萸内服均须经炮制后使用,炮制后吴茱萸较生品降低了辛散之力和毒性^[18]。《中华人民共和国药典》规定最大用量 5 g^[19],临床上常因服用了未制透的吴茱萸或直接服用了生品吴茱萸而产生中毒现象,还有因超剂量服用,患者出现中毒,并在该患者血清中检查出了吴茱萸生物碱^[20-21]。究其原因,吴茱萸功效的发挥和毒性的产生都有必然相关的物质基础,即它的化学成分:主要包括生物碱、苦味素、挥发油、黄酮等化学成分^[22],其中吴茱萸碱、吴茱萸次碱和柠檬苦素是最主要的生物活性成分。

随着吴茱萸及其主要成分在临床上的广泛使用,也暴露了其毒性作用。吴茱萸提取物有急性毒性,肝脏为主要靶器官^[23-24]。研究其提取物对小鼠急性毒性,发现醇提物组毒性强度大于其水提物组^[25-26];课题组前期研究得出相同的结论:醇提物的 LD₅₀ = 17.58 g(生药)/kg,而水提物 MTD = 62.00 g(生药)/kg,所以选用吴茱萸醇提物进行体内遗传毒理学研究,并未首选其主要成分的原因:吴茱萸和吴茱萸次碱单体口服吸收差,生物利用度低^[27-28]。有研究发现,以提取物形式能提高吴茱萸碱和吴茱萸次碱在大鼠体内血药浓度^[29],由于提取物中有效成分溶解度可能在药材的炮制过程中发生改变,多成分间均可能发挥协同效应,从而增加吴茱萸碱和吴茱萸次碱溶解度,最终增加其在体内的吸收;而且,吴茱萸次碱可经细胞色素 P450 (CYP)3A4、CYP1A2、CYP2C9 代谢,提取物中吴茱萸次碱的浓度提高可能与提取物中其他成分对 CYP450 系统酶活性具有抑制作用有关^[30]。所以选用单成分

会影响生物利用度,使得靶组织达不到足够的浓度,出现微核试验假阴性。

有研究发现吴茱萸的毒性大小与产地关系密切,可能与不同产地药材中主要成分含量不同有关^[31];同时也报道称不同产地的吴茱萸中主要成分吴茱萸碱、吴茱萸次碱和柠檬苦素含量均有一定的差异^[32]。在体外研究中发现吴茱萸的主要有效成分吴茱萸碱、吴茱萸次碱和柠檬苦素均能产生肝肾细胞毒性^[33]。以上研究均发现吴茱萸的有效成分与毒性成分相关,所以完善吴茱萸主要成分的毒性研究非常必要。并且吴茱萸醇提物为棕黑色浓稠药液,有成分复杂、不溶物多和溶解度差等特点,使其难以进行体外试验,所以本次研究,选用了单一的主要成分吴茱萸碱、吴茱萸次碱和柠檬苦素完成体外遗传毒性研究,纯化了体外试验条件控制可变因素,有利于结果的观察和数据分析^[34]。

吴茱萸的遗传毒性研究较为匮乏,仅有杨秀伟等^[35]采用 Ames 试验、小鼠精子畸变试验和小鼠骨髓细胞微核试验对吴茱萸水提物和其 70% 乙醇提取物进行了研究,未发现明显的遗传毒性。吴茱萸及其主要成分的遗传毒性亟待展开全面系统地研究。

根据新药非临床安全性评价原则的推荐,本文选用了 Ames 试验(体外细菌回复突变试验)、体外 CHL 细胞染色体畸变试验和小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验进行吴茱萸及其主要成分的遗传毒性研究。

1 试验材料

1.1 受试药物 吴茱萸碱, purity ≥ 98%, 批号: MUST - 12031010, 购自成都曼思特生物科技有限公司;吴茱萸次碱, purity ≥ 99.5%, 批号: MUST - 11122816, 购自成都曼斯特生物科技有限公司;柠檬苦素, purity ≥ 98%, 批号: MUST - 11042012, 购自成都曼斯特生物科技有限公司。分别用 DMSO 溶解, 配成 50 mg/mL 的贮备液, 临用时用灭菌生理盐水稀释至试验浓度。

吴茱萸醇提物(基源:吴茱萸,重庆荣昌红庙村)用 70% 乙醇提取得棕黑色浓稠药液(1 g 提取物相当于 3.055 g 原生药材),由四川省中医药科学院制备提供。

1.2 主要试剂与药品 二甲基亚砜(DMSO), Amresco 0231 - 100 mL; L - 组氨酸, Biotopped, 批号: 20120507; D - 生物素, Amresco, 批号: 0560C286; 叠氮钠, sigma, 批号: 04202DJ; 2 - 氨基苄, sigma, 批号: S09825 - 428; 三硝基苄酮, FLUKA 公司, 批号: 252518; 1,8 - 二羟基蒽醌, sigma, 批号: S52025 - 049; 丝裂霉素, Wako, 批号: DCK2758; 环磷酰胺, sigma, 批号: 120M1253V; DMEM (high glucose) 培养液, Hyclone 公司, 批号:

NWM0524;小牛血清, GIBCO, Lot: 991366, Origin: New zealand;完全培养液(DMEM 培养液 + 10% 小牛血清);胰蛋白酶, GIBCO 分装, purity > 99%, Lot: L101031;MTT, 250 mg, min > 98%, Amresco 0793;秋水仙碱, purity \geq 98%, 批号: MUST - 110, 62206; Giemsa, CAS: 51811 - 82 - 6, Exp. date: Dec. 2012, Grade: Certifiable;其他试剂为国产分析纯试剂。

1.3 主要仪器 SPX - 150B 生化培养箱, 上海浦东荣丰科学仪器有限公司;超净工作台, 上海浦东荣丰科学仪器有限公司;HH - S₂₈₅ 数显恒温水浴锅;SA - 350A 高压灭菌锅;101 = 3 型电热鼓风干燥箱, 上海浦东荣丰科学仪器有限公司;BCD - 198AN 美菱冰箱;电子万用炉, 北京市承光明医疗仪器厂;IG0150 二氧化碳培养箱;倒置式生物显微镜, 型号: ECLIPSE TS100, Nikon 公司;ST - 360 酶标仪, 上海科华实验系统有限公司;恒温水浴锅, 型号: HH - 1, 国华电器有限公司;TD25 - WS 多管架自动平衡离心机;XK96 - 3 型微量振荡器, 姜堰市新康医疗器械有限公司;EQU/06 - EVC 超净工作台。

1.4 菌株 选用 TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535 菌株进行试验, 菌株由成都国家新药安全性评价中心遗传毒理试验室提供。按照试验要求, 对试验拟用的鼠伤寒沙门氏组氨酸缺陷型菌株进行了组氨酸需求试验、结晶紫敏感试验、抗氨苄青霉素试验、抗四环素试验、紫外线敏感试验和自发回变试验。结果显示: 各菌

株的特性正常, 自发回复突变菌落数均在正常范围内, 菌株基因型均符合试验要求。

1.5 细胞及培养条件 CHL 细胞, 由国家成都中药安全性评价中心遗传毒理室提供。完全培养液为含 10% 小牛血清的 DMEM, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育。

1.6 动物 SPF 级昆明小鼠 50 只, 体重 18 ~ 22 g, 雌雄各半。由上海斯莱克实验动物有限公司提供。实验动物生产许可证号: SCXK(沪)2003 - 0003。小鼠饲养于国家成都中药安全性评价中心 SPF 动物房, 温度 20 ~ 25 °C, 相对湿度(55 ± 15)%, 换气次数 10 ~ 20 次/h。饲养条件符合国标 GB14922.2 - 2001。

2 统计方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计处理计量资料, 多组间比较采用单因素方差分析法(One - way ANOVA)和两两比较采用 Dunnett 法和 LSD 法;计数资料采用卡方检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

3 试验方法

3.1 Ames 试验 采用平板掺入法进行试验, 根据预试结果, 吴茱萸碱、吴茱萸次碱和柠檬苦素分别设 5 个受试物剂量组(0.000 5、0.005、0.05、0.5、5 mg/皿), 同时设自发回变对照组和阳性对照组。每组 3 个平行皿。37 °C 培养 48 h, 计数各平板菌落数并算出均值。平行做加和不加 S9 的试验, 试验重复一次。阳性对照药物使用情况见表 1。

表 1 Ames 试验阳性对照药物($\mu\text{g}/\text{皿}$)

Positive control	TA97		TA98		TA100		TA101 * 2		TA1535	
	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)
Sodium azide					1.5	-	1.5	-		
2 - aminofluorene	-	10	-	10	-	10	-	10		
3 nitro fluorenone	0.2	-	0.2	-						
1,8 - dihydroxy anthraquinone									-	50
MitomycinC									0.5	-

3.2 染色体畸变试验 将指数生长的 CHL 细胞接种在 100 mL 的培养瓶中, 细胞浓度为 $8 \times 10^4/\text{mL}$, 每瓶接种 5 mL, 共接种 72 瓶, 培养 24 h 后, 分别按吴茱萸碱、吴茱萸次碱和柠檬苦素分别为 0.5 mg/mL、0.05/mL 和 0.005 mg/mL, 阴性对照(生理盐水), 溶剂对照和阳性对照(+S9: 环磷酰胺 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、-S9: 丝裂霉素 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。加入药物, 分别培养 4 h 和 24 h, 4 h 组设 +S9 组。分别取细胞培养液制作染色体玻片标本, 各组观察 100 个中期分裂相细胞, 计数其染色体畸变率。试验重复一次。

3.3 小鼠嗜多染红细胞微核试验 将 50 只小鼠随机分为 5 组, 每组 10 只, 雌雄各半。根据前期试验数据,

吴茱萸醇提物对小鼠 $\text{LD}_{50} = 17.58 \text{ g(生药)}/\text{kg}$ 以及预试验结果, 吴茱萸醇提物的低、中、高剂量分别为 0.88、3.52 和 10.55 g(原药材)/kg, 同时设立阴性对照组和阳性对照(环磷酰胺 50 mg/kg)^[36]。受试药物组小鼠每天给药 1 次, 连续 4 d 经口灌胃给药。阳性对照组于处死前 1 d 给药。于末次给药后 24 h 颈椎脱臼法处死小鼠, 取出胸骨骨髓制片, 计数 1000 个嗜多染红细胞, 并记录微核发生率(%), 同时计数 200 个红细胞求出多染红细胞/正染红细胞的比值。

4 结果

4.1 Ames 试验结果 计算同一菌株同一剂量组的 3

个平行培养皿上的平均菌落数和标准差,表 2、表 3 和表 4 结果显示:在加与不加 S9 的条件下,TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535 的自发回变菌落数均在正常范围内,5 个菌株的阳性对照均高于相应的自发回变菌

落数两倍以上,证明试验系统可靠;吴茱萸碱、吴茱萸次碱和柠檬苦素各剂量组回变菌落数均未高于相应菌株自发回变菌落数的两倍,且无剂量-反应关系。试验重复一次,所得结论相同。

表 2 吴茱萸碱 Ames 实验结果

Dose mg/dish	TA97		TA98		TA100		TA102		TA1535	
	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)
5	150.3 ± 21.2	142.3 ± 43.7	17.7 ± 2.5	18.7 ± 2.5	120.7 ± 27.2	185.7 ± 20.5	169.0 ± 18.4	193.3 ± 50.0	13.7 ± 2.1	11.3 ± 2.1
0.5	184.0 ± 28.1	158.7 ± 40.1	16.0 ± 3.6	16.3 ± 3.5	142.0 ± 15.9	169.3 ± 25.3	179.0 ± 26.4	211.0 ± 26.5	14.7 ± 3.5	16.0 ± 2.0
0.05	155.0 ± 40.9	173.3 ± 21.9	16.0 ± 3.0	15.3 ± 2.5	139.7 ± 21.4	216.7 ± 27.1	182.7 ± 17.8	198.7 ± 38.9	16.7 ± 2.1	13.7 ± 5.0
0.005	146.3 ± 23.8	158.7 ± 35.2	18.0 ± 4.0	15.0 ± 4.0	156.0 ± 31.7	189.0 ± 22.5	151.0 ± 27.2	184.3 ± 19.4	14.7 ± 2.1	14.0 ± 2.6
0.0005	138.0 ± 20.4	134.3 ± 29.6	13.7 ± 1.5	16.0 ± 1.7	163.0 ± 33.9	182.3 ± 18.1	163.7 ± 43.6	180.7 ± 16.2	15.0 ± 1.0	11.3 ± 1.5
Spon.	111.7 ± 3.5	133.3 ± 50.0	16.7 ± 2.1	17.3 ± 6.0	156.3 ± 40.1	191.3 ± 33.2	168.3 ± 37.9	179.7 ± 18.2	16.0 ± 1.0	15.7 ± 2.5
Posi.	366.3 ± 54.0 *	497.0 ± 83.7 *	403.0 ± 26.0 *	791.7 ± 128.0 *	793.3 ± 168.1 *	894.0 ± 77.3 *	581.3 ± 156.7 *	762.7 ± 173.1 *	584.3 ± 200.9 *	154.7 ± 29.1 *

Note: * the number of revertant colony were more than the twice of the corresponding spontaneous revertant colony.

表 3 吴茱萸次碱 Ames 实验结果

Dose mg/dish	TA97		TA98		TA100		TA102		A1535	
	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)
5	144.0 ± 14.4	129.0 ± 33.4	14.6 ± 3.5	12.7 ± 3.1	150.3 ± 18.0	185.3 ± 25.5	169.0 ± 37.6	189.3 ± 16.0	15.0 ± 3.6	14.0 ± 3.6
0.5	137.3 ± 41.2	169.0 ± 27.9	15.3 ± 4.5	14.7 ± 3.8	178.3 ± 33.0	191.7 ± 30.6	159.3 ± 38.8	208.0 ± 40.8	14.7 ± 3.2	14.0 ± 3.5
0.05	156.3 ± 30.0	117.7 ± 21.5	15.7 ± 2.5	17.7 ± 2.5	167.7 ± 45.8	179.3 ± 24.0	187.0 ± 19.7	197.7 ± 5.5	14.3 ± 1.2	12.3 ± 1.5
0.005	127.3 ± 37.6	145.7 ± 20.6	15.0 ± 3.6	12.3 ± 2.3	150.0 ± 43.9	165.0 ± 25.2	208.0 ± 18.5	203.3 ± 17.6	14.7 ± 3.2	16.3 ± 4.2
0.0005	132.0 ± 20.0	150.0 ± 49.6	13.3 ± 2.3	14.7 ± 1.5	157.0 ± 38.7	190.3 ± 8.4	208.3 ± 48.7	166.3 ± 18.8	13.7 ± 4.0	14.0 ± 2.6
自发	111.7 ± 3.5	133.3 ± 50.0	16.7 ± 2.1	17.3 ± 6.0	156.3 ± 40.1	191.3 ± 33.2	168.3 ± 37.9	179.7 ± 18.2	16.0 ± 1.0	15.7 ± 2.5
阳性	366.3 ± 54.0 *	497.0 ± 83.7 *	403.0 ± 26.0 *	791.7 ± 128.0 *	793.3 ± 168.1 *	894.0 ± 77.3 *	581.3 ± 156.7 *	762.7 ± 173.1 *	584.3 ± 200.9 *	154.7 ± 29.1 *

Note: * the number of revertant colony were more than the twice of the corresponding spontaneous revertant colony.

表 4 柠檬苦素 Ames 实验结果

Dose mg/dish	TA97		TA98		TA100		TA102		A1535	
	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)
5	157.7 ± 35.1	143.3 ± 45.6	11.7 ± 2.1	13.0 ± 2.6	108.7 ± 20.8	161.7 ± 52.7	147.3 ± 37.8	217.3 ± 32.8	12.3 ± 1.5	15.7 ± 0.6
0.5	201.3 ± 12.1	160.0 ± 39.2	20.0 ± 2.6	11.3 ± 2.1	146.7 ± 9.2	182.7 ± 39.0	189.3 ± 18.2	232.7 ± 33.0	15.0 ± 1.0	15.0 ± 4.0
0.05	203.0 ± 7.0	155.7 ± 49.3	15.3 ± 7.5	14.3 ± 1.5	153.0 ± 30.0	203.0 ± 51.5	201.0 ± 49.5	200.3 ± 29.3	13.0 ± 2.0	16.0 ± 3.6
0.005	129.3 ± 25.1	148.7 ± 46.0	11.3 ± 3.5	12.7 ± 2.9	187.3 ± 38.2	159.3 ± 38.1	175.3 ± 23.5	211.0 ± 41.6	13.7 ± 3.1	13.7 ± 2.1
0.0005	123.7 ± 41.7	168.0 ± 27.5	16.7 ± 7.0	13.0 ± 1.7	160.7 ± 39.2	200.7 ± 22.5	164.7 ± 15.1	232.7 ± 39.5	15.7 ± 2.1	16.3 ± 3.5
自发	111.7 ± 3.5	133.3 ± 50.0	16.7 ± 2.1	17.3 ± 6.0	156.3 ± 40.1	191.3 ± 33.2	168.3 ± 37.9	179.7 ± 18.2	16.0 ± 1.0	15.7 ± 2.5
阳性	366.3 ± 54.0 *	497.0 ± 83.7 *	403.0 ± 26.0 *	791.7 ± 128.0 *	793.3 ± 168.1 *	894.0 ± 77.3 *	581.3 ± 156.7 *	762.7 ± 173.1 *	584.3 ± 200.9 *	154.7 ± 29.1 *

Note: * the number of revertant colony were more than the twice of the corresponding spontaneous revertant colony.

4.2 染色体畸变试验结果 阴性对照组染色体畸变率 < 5%, 阳性对照中直接诱变剂丝裂霉素 (1.25 μg/mL) 组细胞染色体畸变率增高 (56%), 与阴性对照比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 49.08 > \chi_{0.05, 1}^2 = 3.84, P < 0.05$)。间接诱变剂环磷酸胺 (CP, 25 μg/mL), 在 S9 活化条件下染色体畸变率增高 (63%), 与阴性对照比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 39.02 > \chi_{0.05, 1}^2 = 3.84, P < 0.05$), 表明本试验系统可靠。

计数吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素各剂量组对 CHL 细胞的染色体畸变率, 通过卡方检验进行比较分析发现: 吴茱萸碱在加 S9 和不加 S9 的情况下, 各剂量组的细胞染色体畸变率与阴性对照组比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2 < \chi_{0.05, 1}^2 = 3.84, P > 0.05$), 试验重复 1

次, 结论相同; 吴茱萸次碱 24 h 组细胞染色体畸变率略有增加, 且与阴性对照组比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 > \chi_{0.05, 1}^2 = 3.84, P < 0.05$), 试验重复 1 次, 结论相同; 柠檬苦素在加 S9 和不加 S9 的情况下, 4 h 和 24 h 高、中剂量组的细胞染色体畸变率略有增加, 且与阴性对照组比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 > \chi_{0.05, 1}^2 = 3.84, P < 0.05$), 而低剂量组与阴性对照比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2 < \chi_{0.05, 1}^2 = 3.84, P > 0.05$)。阳性组与阴性对照组比较, 细胞染色体畸变率差异有统计学意义 ($\chi^2 > \chi_{0.05, 1}^2 = 3.84, P < 0.05$)。检测到的主要染色体畸变类型: 双着丝粒 (dic)。吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素对 CHL 细胞染色体畸变试验结果见表 5。

表5 吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素对 CHL 细胞染色体畸变率的影响

Test materials	Concentration mg/mL	S9	Exposure duration (h)	Cell number of observation (个)	Type of aberration								rate %	Result criterion
					ctb	cte	dic	f	r	p vz	pol	g		
evodiamine	0.5	-	4	100	1	0	2	0	0	0	1	0	3	-
		+	4	100	0	1	2	0	1	0	2	0	4	-
	0.05	-	4	100	2	1	1	0	0	0	0	0	4	-
		+	4	100	1	1	2	0	0	0	0	0	4	-
	0.005	-	4	100	0	1	2	0	0	1	0	1	4	-
		+	4	100	0	1	2	0	0	0	0	0	3	-
rutaecarpin	0.5	-	4	100	0	0	2	0	0	0	2	0	2	-
		+	4	100	0	0	4	0	0	0	2	0	4	-
	0.05	-	4	100	1	1	2	0	0	0	1	1	4	-
		+	4	100	1	0	3	0	0	0	0	0	4	-
	0.005	-	4	100	1	0	3	0	0	0	0	0	4	-
		+	4	100	2	1	0	0	0	0	1	0	3	-
limonin	0.5	-	4	100	1	0	12	0	0	0	0	0	13*	+
		+	4	100	2	1	8	0	0	1	1	0	11*	+
	0.05	-	4	100	1	0	10	0	0	1	0	0	11*	+
		+	4	100	0	1	9	0	0	0	2	0	10*	+
	0.005	-	4	100	0	2	5	1	1	0	0	0	9	±
		+	4	100	1	1	6	0	0	0	1	0	8	±
Negative control	0	-	4	100	1	0	1	0	0	0	0	0	2	-
		+	4	100	0	1	0	0	1	0	0	0	2	-
MMC	1.25 μg/mL	-	4	100	13	10	15	2	1	15	0	1	56*	+++
CP	25 μg/mL	+	4	100	11	12	29	1	0	10	1	1	63*	+++
evodiamine	0.5	-	24	100	1	1	2	0	0	0	0	0	4	-
		-	24	100	0	0	3	0	0	0	0	0	3	-
		-	24	100	2	0	2	0	0	0	0	0	4	-
rutaecarpin	0.5	-	24	100	0	1	11	0	0	2	0	1	14*	+
		-	24	100	5	2	5	0	1	0	0	0	13*	+
		-	24	100	1	1	10	0	0	1	0	1	13*	+
limonin	0.5	-	24	100	1	0	10	0	0	0	0	0	13*	+
		-	24	100	1	1	9	0	0	1	0	0	11*	+
		-	24	100	1	0	7	0	1	0	0	0	9	±
Negative control	0	-	24	100	1	0	1	0	0	0	0	0	2	-
MMC	1.25 μg/mL	-	24	100	15	9	20	3	0	9	1	0	56*	+++

Note: * Compared with negative control, the difference was statistically significant ($P < 0.05$) etb; chromatid break; cte; chromatid exchange; f; fragment; dic; dicentric; r; circular chromosome; pol; multiploid; pvz; crush; g; gap.

表6 吴茱萸醇提取物的小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验结果

Sex	Group	Dose (g raw drug/kg)	Animal number	Cell number of observation (个)	PCE/NCE	Cell number of micronucleus	Micronucleus rate (%)
F	Extract	10.55	5	5000	0.67 ± 0.05	8	1.6 ± 1.8
		3.52	5	5000	0.79 ± 0.09	6	1.2 ± 1.3
		0.88	5	5000	0.81 ± 0.10	6	1.2 ± 1.3
	Control	0	5	5000	0.93 ± 0.03	9	1.8 ± 1.5
		CP	5	5000	0.80 ± 0.08	129	25.8 ± 8.08*
M	Extract	10.55	5	5000	0.70 ± 0.04	9	1.8 ± 0.5
		3.52	5	5000	0.77 ± 0.09	8	1.6 ± 1.1
		0.88	5	5000	0.73 ± 0.08	4	0.8 ± 0.8
	Control	0	5	5000	0.72 ± 0.07	8	1.6 ± 1.5
		CP	5	5000	0.69 ± 0.09	116	23.2 ± 8.6*

Note: * Compared with negative control, the difference was statistically significant ($P < 0.05$)

4.3 微核试验结果 阳性对照组小鼠骨髓细胞微核发生率明显高于阴性对照组,且差异有统计学意义(P

< 0.05),证明试验系统可靠。吴茱萸醇提取物各剂量组小鼠骨髓细胞微核发生率与阴性对照组比较无明显

体内研究,给予大鼠商陆水煎液 35 d 可致肾脏损伤,其病理损伤主要表现为肾小管上皮细胞变性、蛋白管型,且恢复期部分损伤可逆^[6]。文献报道,商陆皂苷甲能够引起 BXSB 小鼠肾小球和肾小管细胞的凋亡,其作用机理可能与下调 BXSB 小鼠肾组织中 Bcl-2(凋亡调节蛋白)的表达和 Bcl-2/Bax 的比值从而加速细胞凋亡有关^[8]。人肾小管上皮细胞(HK-2 细胞系)是成人肾细胞,其功能接近原代培养的肾小管上皮细胞,已经成为研究各种药物肾毒性及肾小管损伤机制的重要细胞模型^[9-11]。

本研究表明,大于 100 μg · mL⁻¹ 商陆皂苷甲对 HK-2 细胞(人肾小管上皮细胞)有明显的毒性作用,提示商陆皂苷甲可能是中药商陆致肾毒性的物质基础之一,其对肾细胞毒性机制与致细胞氧化应激、凋亡相关。

参考文献

[1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社,2010.
 [2] 黄国英,刘星星. 中药商陆的药理及应用研究[J]. 中国实用医药, 2013,8(15):249-250.

[3] 赵国栋,王立宽,段静,等. 商陆不同极性、根和茎提取物的抑菌性能分析[J]. 基因组学与应用生物学,2010,29(4):717-720.
 [4] 李一飞,姚广涛. 商陆药理作用及毒性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(13):248-251.
 [5] 陈金香. 中西医结合治疗急性商陆中毒 26 例[J]. 浙江中医药大学学报,2010,34(2):221.
 [6] 李一飞,徐婷婷,姚广涛,等. 尿液 NGAL, KIM-1, IL-18 在商陆所致的大鼠肾损伤中的变化特征及其联合检测的意义[J]. 中国中药杂志,2012,37(23):3611-3617.
 [7] 马杰,赖道万,孙文基. 商陆药材中商陆皂苷甲的含量测定[J]. 药物分析杂志,2010,30(1):163-165.
 [8] Hu Z, Qiu L, Xiao Z et al. Effects of esculentoside A on autoimmune syndrome induced by Campylobacter jejuni in mice and its modulation on T-lymphocyte proliferation and apoptosis[J]. International Immunopharmacol,2010,10(1):65-71.
 [9] 崔晋峰,邢凌霄,李增宁,等. 赭曲霉毒素 A 对体外培养人肾小管上皮细胞凋亡的作用[J]. 细胞生物学杂志,2008,30(2):243-246.
 [10] 魏佳莉,王畅,彭佑铭,等. 黄芪对人肾小管上皮细胞细胞外基质分泌的影响及其机制探讨[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2009,10(8):664-667.
 [11] 闫长会,吴纯启,廖明阳. 肾近端小管细胞系在药物肾毒性评价中的应用[J]. 国外医学药学分册,2003,30(4):234-237.

(2014-01-06 收稿 责任编辑:洪志强)

(上接第 150 页)

[16] Kobayashi Y, Hoshikume K, Nakano Y, et al. The positive inotropic and chronotropic effects of evodiamine and rutaecarpine, indolquinazoline alkaloids isolated from the fruits of Evodia rutaecarpa, on the guinea pig isolated right atrial possible involment of vanilloid receptors [J]. Planta Med,2001,67(3):2442-2481.
 [17] 肖红,林强,易美华. 两种抗菌防腐剂的抑菌作用研究[J]. 海南大学学报:自然科学版,2002,20(03):231-235.
 [18] 张晓凤,高南南,李飞,等. 吴茱萸炮制前后挥发油成分及毒性的比较研究[J]. 解放军药学报,2011,27(3):229-232.
 [19] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社,2010.
 [20] 蔡雪映,孟楠,杨冰. 服用吴茱萸过量致中毒 1 例分析[J]. 北京中医,2006,25(3):171-172.
 [21] 陈云云,袁玉芬. 浅谈吴茱萸的中毒与治疗[J]. 浙江中西医结合杂志,1999,9(4):58.
 [22] 龚慕辛,王智民,张启伟,等. 茱萸有效成分的药理研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2009,20(2):183-187.
 [23] 周绮,张茜,金若敏. 吴茱萸致小鼠肝毒性时效、量效关系研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(9):232-235.
 [24] 张茜,周绮,金若敏. 吴茱萸次碱对肝肾毒性的初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):221-225.
 [25] 王会,朱兰兰,黄伟,等. 提取方式对吴茱萸“质量-毒性”综合评价模式的影响[J]. 中国药物警戒,2012,9(5):279-281.
 [26] 黄伟,赵燕,孙荣. 吴茱萸不同组分对小鼠急性毒性试验比较研究[J]. 中国药物警戒,2010,7(3):129-134.
 [27] Ding JS, Gao R, Li D, et al. Solid dispersion of rutaecarpine improved its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats[J]. Biopharm Drug Dispos,2008,29(9):495.

[28] Shyr M, Lin L, Lin T, et al. Determination and pharmacokinetics of evodiamine in the plasma and feces of conscious rats [J]. Anal Chim Acta, 2006,558(1-2):16.
 [29] 张丽,徐世希,王婷,等. 大鼠灌胃不同纯度吴茱萸提取物后吴茱萸碱及吴茱萸次碱的药动学研究[J]. 中国药房,2012,23(21):1967-1969.
 [30] Lee SK, Lee JH, Yoo HH, et al. Characterization of human liver cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of rutaecarpine [J]. J Pharmaceut Biomed,2006,41(1):304.
 [31] 李莉,赵军宁,易进海,等. 吴茱萸多基原、多产地毒性效应特征研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(15):2219-2222.
 [32] 任雪松,周先建,张美,等. 川渝两地吴茱萸的有效成分测定分析[J]. 资源开发与市场,2011,27(4):292-294.
 [33] 周倩,金若敏,姚广涛. 吴茱萸中 4 种单体成分致肾细胞毒性的初步研究[J]. 中国药物警戒,2013,10(1):1-5.
 [34] 李慧颖,王秀坤,王玉刚,等. 不同孔径透析袋对吴茱萸汤提取物入血成分透过的影响—体外药理实验中中药提取物样品前处理的可行性[J]. 世界科学技术:中医药现代化,2010,12(4):515-520.
 [35] 杨秀伟. 吴茱萸水和 70% 乙醇提取物的急性毒性和遗传毒性试验[J]. 中国中药杂志,2008,33(11):1317-1321.
 [36] 肖凯,李宏霞. 环磷酰胺剂量、取样时间对小鼠骨髓微核率的影响[J]. 癌变畸变突变,2005,17(6):367-369.
 [37] Miller B, Potter-Locher F, Seelbach A, et al. Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM working group on the in vitro micronucleus test [J]. Mutat Res,1998,410:81-116.
 [38] 尤育初,糜静娟,廖青,等. 615 系小鼠血容量及红细胞比积的测定[J]. 上海畜牧兽医通讯-实验动物科学专辑,1982,2(3):125-127.

(2014-01-06 收稿 责任编辑:洪志强)