

健脾生血颗粒遗传毒性研究

赵刚¹ 张寅静² 郭小娟¹ 杨艳霞¹ 夏纯¹ 黄志军¹

(1 健民药业集团儿童药物研究院, 武汉, 430052; 2 湖北省食品药品安全评价中心, 武汉, 430073)

摘要 目的: 考察健脾生血颗粒的遗传毒性。方法: 分别采用组氨酸营养缺陷性鼠伤寒沙门氏菌 TA97a、TA98、TA100、TA102、TA1535 回复突变试验(Ames 试验), CHO-K1 细胞染色体畸变试验, 以及小鼠骨髓细胞微核试验考察健脾生血颗粒的遗传毒性。结果: Ames 试验结果显示, 健脾生血颗粒无论在含有和不含有 S9 的条件下, 在所有评估剂量水平的所有测试菌中均可观察到重复正常生长, 且所有剂量的回复突变数与阴性对照组相比均无 2 倍或以上的显著上调, 且无剂量反应关系; CHO-K1 细胞染色体畸变试验结果显示, 健脾生血颗粒 650、130、26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3 个剂量组的 CHO-K1 细胞染色体畸变率均小于 5%; 小鼠骨髓细胞微核试验结果显示, 健脾生血颗粒 3 个剂量组[2 000、1 000 和 500 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$] 与阴性对照组间微核率差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论: 在本试验条件下, 健脾生血颗粒未见遗传毒性作用。

关键词 健脾生血颗粒; 遗传毒性; 微粒体回复突变试验; 染色体畸变试验; 微核试验

Genotoxicity evaluation of Jianpi Shengxue Granule

Zhao Gang¹, Zhang Yinjing², Guo Xiaojuan¹, Yang Yanxia¹, Xia Chun¹, Huang Zhijun¹

(1 Academy of Pediatric Drugs, Jianmin Pharmaceutical Group, Wuhan 430052, China;

2 Center of food and drug safety evaluation in Hubei, Wuhan 430073, China)

Abstract Objective: To evaluate the genotoxicity of Jianpi Shengxue Granule. **Methods:** Genotoxicity of Jianpi Shengxue Granule was studied using Ames test, CHO-K1 cell chromosomal aberration test, and mouse bone marrow cell micronucleus assay, respectively. **Results:** The Ames test results indicated that Jianpi Shengxue Granule did not affect the normal growth of tested bacteriums at all dosages with or without S9. Compared with the negative control group, all number of reversion mutation had no significant up-regulation, and no dose-response relationship was found. Results of CHO-K1 cell chromosomal aberration test indicated that the aberration rates of Jianpi Shengxue Granule group(650, 130, and 26 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were all less than 5%. Results of micronucleus assay indicated that there was no statistical difference of micronucleus rate between the Jianpi Shengxue Granule group(2 000, 1 000, and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and negative group($P > 0.05$). **Conclusion:** No genotoxicity of Jianpi Shengxue Granule was found under the conditions of this study.

Key Words Jianpi Shengxue Granule; Genotoxicity; Ames test; Chromosomal aberration test; Micronucleus assay

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2016.12.061

健脾生血颗粒与健脾生血片是健民药业集团股份有限公司独家产品, 二者处方一致, 主要成分均为党参、茯苓、黄芪、山药、鸡内金、龟甲、大枣等, 临床常用于妊娠期妇女、小儿以及成人缺铁性贫血的治疗, 尤其是脾胃虚弱及心脾两虚、气血两虚型贫血。该产品临床应用已有 30 余载, 有效性和安全性得到了充分验证^[1-3]。然而, 随着产品市场不断扩大, 患者安全意识逐渐提高, 以及医生对该产品的深入认识需求不断加大, 国家鼓励药企对已批准生产的药品进行上市后再评价研究, 尤其是安全性评价研究^[4]。为了进一步验证其安全性, 我们在已有一般毒性研究资料的基础上开展了生殖毒性和遗传毒性试验研究。本课题将通过体外细菌^[5]、离体细胞^[6]、

以及在体动物^[7]等载体分别建立试验模型, 考察健脾生血颗粒的遗传毒性情况。

1 材料与方法

1.1 实验药品 健脾生血颗粒(健民药业集团股份有限公司生产, 批号: 140111-18)。溶媒对照为纯水(实验室自制)和二甲基亚砜(DMSO, 分析纯)(国药集团化学试剂有限公司生产, 批号: 20121130)。阳性对照: 叠氮钠(Amresco 公司生产, 批号: 0703C083), 敌克松(Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司生产, 批号: 70321), 2-氨基苄(Sigma-Aldrich 公司生产, 批号: S90850V), 1, 8-二羟基蒽醌(Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司生产, 批号: 10507), 环磷酸胺(Sigma-Aldrich 公司生产, 批号: 079K1569),

基金项目: 武汉市“汉阳英才计划”项目(编号: A3-17)

作者简介: 赵刚(1983—), 男, 博士, 高级工程师, 从事药物新药开发、药理毒理研究, Tel: (027)84523889, E-mail: 158200458@qq.com

通信作者: 黄志军(1972—), 男, 博士, 教授级高级工程师, 从事中药药理学研究, Tel: (027)84520229, E-mail: 542354589@qq.com

甲磺酸乙酯 (Sigma-Aldrich 公司, 批号: BCBC4573V)。

1.2 菌株及细胞 组氨酸营养缺陷性鼠伤寒沙门氏菌 TA97a、TA98、TA100、TA102、TA1535, 购于 MO-LTOX 公司。CHO-K1 细胞株, 购于中国典型培养物保藏中心(武汉大学)。冻存的细胞株复苏后经过传代、培养, 细胞密度达到 $1.5 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5/\text{mL}$ 时用于本课题相关试验。

1.3 实验动物 SPF 级昆明种雄性小鼠, 6~8 周龄, 体重 25~30 g, 购于湖北省实验动物研究中心, 实验动物使用许可证号: SYXK(鄂)2012-0065, 所有动物适应性喂养及检疫期 5 d 后给药。动物饲养于 IVC 笼中, 每笼 3 只, 垫料为武汉市万千佳禾实验动物养殖有限公司提供的刨花垫料。动物房相对湿度控制范围为 45%~58%, 温度控制范围为 22~25 °C。光照: 10 h 明/14 h 暗循环交替至实验结束。

1.4 实验方法

1.4.1 Ames 试验 取 TA97a、TA98、TA100、TA102 以及 TA1535 作为试验菌株, 采用平板掺入法, 分为含有和不含有大鼠肝匀浆 S9 两种情况试验。健脾生血颗粒选 5 个剂量用于试验, 分别为 65.00、21.67、7.22、2.41 和 0.80 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 。阳性对照组选用敌克松(50 $\mu\text{g}/\text{皿}$)为 TA97a、TA98、TA102 菌株不含 S9 的阳性对照物; 叠氮钠(1.5 $\mu\text{g}/\text{皿}$)为 TA100、TA1535 菌株不含 S9 的阳性对照物; 2-氨基苄(10 $\mu\text{g}/\text{皿}$)为 TA97a、TA98、TA100 菌株含有 S9 的阳性对照物; 1,8-二羟基蒽醌(50 $\mu\text{g}/\text{皿}$)为 TA102 菌株含有 S9 的阳性对照物; 环磷酰胺(50 $\mu\text{g}/\text{皿}$)为 TA1535 菌株含有 S9 的阳性对照物。同体积(0.1 mL)的溶媒为阴性对照物, 自发回变组不对试验菌液做任何处理。所有试验平板在掺入法操作结束后, 在 $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ 温度下倒置培养 $(52 \pm 4)\text{h}$, 计数菌落数。

1.4.2 CHO-K1 细胞染色体畸变试验 健脾生血颗粒选取 3 个剂量用于试验, 分别为 650、130 和 26 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 各剂量组受试物制剂无菌条件下配制后用于试验。同时设置 2 组阴性对照组(分别给予总体积 0.5% 的 DMSO 和纯水)和 2 组阳性对照组, 后者给予同体积的 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 除菌环磷酰胺(+S9)和 0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 除菌甲磺酸乙酯(-S9)。大鼠肝匀浆混合液+S9 均加入 0.5 mL。在含有或不含代谢活化条件的系统(+S9/-S9)下, 对正在增殖期的细胞进行给药, 给药持续时间 4 h, 并在给药开始后 22 h 收获细胞。收获前以秋水仙碱处理细胞培养物 4 h。

各组细胞培养物分别离心(1 000 r/min)5 min、低渗处理 20 min、预固定 2 min、固定 5 min, 1 000 r/min 离心富集细胞, 染色, 以制备染色体于显微镜下观察染色体数量和结构的改变。每个组别至少计数 200 个分散良好的中期分裂相细胞, 计数其染色体畸变率。

1.4.3 小鼠骨髓细胞微核试验 试验小鼠随机分为 5 组, 分别为健脾生血颗粒高、中、低剂量组[给药剂量分别为 2 000、1 000 和 500 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]、阴性对照组(给予同体积的纯水)以及阳性对照组(单次腹腔注射给予环磷酰胺 10 mL/kg)。除阳性对照组外, 其余动物均采取单次灌胃方式给药。阴性对照组及健脾生血颗粒各剂量组中的一半动物于给药开始后 24 h 处死, 另一半于给药开始后 48 h 处死, 阳性对照组动物于给药后 24 h 处死。处死后的动物取股骨, 蘸取少量小牛血清作骨髓涂片, 甲醇固定, Gimesa 染色, 显微镜下观察并对微核进行计数, 每只小鼠计数 1 000 个嗜多染红细胞(PCE), 以含微核的 PCE 千分率计算微核率。

1.5 统计学方法 Ames 试验统计分析时的实验单位为平皿数, 计数每个平皿的回变菌落数, 并统计各剂量 3 个平皿回变菌落数的均数和标准差。对于某个菌株任一剂量的健脾生血颗粒所诱导的菌落回变数, 与相应的溶媒对照组相比, 具有 2 倍或以上的显著上调, 并且该上调具有显著的剂量相关性, 则认为该受试物为诱变阳性。CHO-K1 细胞染色体畸变试验和小鼠骨髓细胞微核试验均采用 χ^2 检验方法, 与阴性对照组进行比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ames 试验结果 菌落计数结果显示, 健脾生血颗粒无论在含有和不含有 S9 的条件下, 在所有评估剂量水平的所有测试菌中均可观察到重复正常生长, 且所有剂量的回复突变数与阴性对照组相比均无 2 倍或以上的显著上调, 且无剂量反应关系。所有阳性和阴性对照值在可接受范围内, 并满足所有有效试验的标准, 表明健脾生血颗粒对鼠伤寒沙门氏菌无致突变性。见表 1、表 2。

2.2 CHO-K1 细胞染色体畸变试验 CHO-K1 细胞染色体观察结果显示, 纯水阴性对照组和 DMSO 阴性对照组的 CHO-K1 细胞染色体畸变率均小于 5%, 而环磷酰胺阳性对照组和甲磺酸乙酯阳性对照组的 CHO-K1 细胞染色体畸变率均大于 10%, 验证了该评价系统的有效性。受试物健脾生血颗粒高、中、低

3个剂量组的 CHO-K1 细胞染色体畸变率均小于 5%，呈阴性结果，表明在该试验条件下，健脾生血颗粒对 CHO-K1 细胞染色体无致畸作用。见表 3。

2.3 小鼠骨髓细胞微核试验 健脾生血颗粒各剂量组在给药直至取材前，所有动物均未见异常。健

脾生血颗粒对小鼠骨髓细胞微核率的影响。结果显示，健脾生血颗粒各剂量组与阴性对照组间小鼠骨髓细胞微核率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)，结果为阴性，表明健脾生血颗粒无致突变作用。见表 4。

表 1 健脾生血颗粒 Ames 试验第 1 次菌落计数结果 (Mean ± SD)

组别	受试剂量 (μg/皿)	菌株 TA97a		菌株 TA98		菌株 TA100		菌株 TA102		菌株 TA1535	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
健脾生血颗粒	65.00	141 ± 14	134 ± 8	48 ± 5	49 ± 4	173 ± 27	166 ± 14	309 ± 20	322 ± 6	20 ± 1	24 ± 3
	21.67	158 ± 19	124 ± 3	44 ± 6	49 ± 7	195 ± 14	188 ± 25	295 ± 22	318 ± 27	18 ± 3	22 ± 2
	7.22	149 ± 11	146 ± 15	51 ± 8	44 ± 10	188 ± 16	184 ± 21	310 ± 11	305 ± 25	17 ± 5	24 ± 2
	2.41	142 ± 15	128 ± 3	49 ± 6	48 ± 3	179 ± 22	199 ± 7	303 ± 26	315 ± 22	18 ± 1	25 ± 1
	0.80	160 ± 11	132 ± 18	47 ± 6	46 ± 2	151 ± 11	190 ± 18	287 ± 16	296 ± 6	19 ± 4	22 ± 2
纯水对照组		130 ± 22	145 ± 12	49 ± 3	51 ± 2	190 ± 25	172 ± 7	319 ± 19	313 ± 9	20 ± 1	25 ± 4
DMSO 对照组		144 ± 17	149 ± 17	50 ± 5	48 ± 9	205 ± 10	188 ± 19	291 ± 6	299 ± 4	18 ± 3	22 ± 3
自发回变组		129 ± 9	135 ± 14	46 ± 3	34 ± 11	195 ± 10	193 ± 19	321 ± 6	311 ± 6	20 ± 2	22 ± 3
阳性对照组		1 443 ± 1	1 598 ± 60	924 ± 32	1 093 ± 32	1 134 ± 88	1 433 ± 39	1 515 ± 73	1 043 ± 64	833 ± 10	501 ± 29

表 2 健脾生血颗粒 Ames 试验第 2 次菌落计数结果 (Mean ± SD)

组别	受试剂量 (μg/皿)	菌株 TA97a		菌株 TA98		菌株 TA100		菌株 TA102		菌株 TA1535	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
健脾生血颗粒	65.00	121 ± 13	150 ± 9	49 ± 7	51 ± 5	186 ± 8	205 ± 35	301 ± 26	311 ± 18	20 ± 4	25 ± 6
	21.67	119 ± 5	150 ± 13	43 ± 3	48 ± 2	197 ± 10	315 ± 12	281 ± 4	309 ± 19	24 ± 2	21 ± 3
	7.22	114 ± 13	137 ± 18	47 ± 4	43 ± 5	193 ± 11	206 ± 15	288 ± 22	314 ± 21	24 ± 3	23 ± 1
	2.41	116 ± 9	126 ± 6	44 ± 2	48 ± 4	195 ± 2	190 ± 20	313 ± 10	320 ± 18	26 ± 3	21 ± 4
	0.80	110 ± 10	149 ± 15	36 ± 5	45 ± 6	209 ± 10	190 ± 27	302 ± 18	302 ± 9	24 ± 3	22 ± 2
纯水对照组		119 ± 18	143 ± 14	41 ± 8	42 ± 11	205 ± 25	200 ± 22	295 ± 17	297 ± 15	24 ± 2	25 ± 1
DMSO 对照组		101 ± 11	146 ± 21	30 ± 4	47 ± 9	193 ± 14	186 ± 26	303 ± 24	309 ± 17	21 ± 2	24 ± 2
自发回变组		116 ± 6	148 ± 10	40 ± 9	39 ± 2	203 ± 11	222 ± 10	295 ± 25	304 ± 4	23 ± 1	23 ± 4
阳性对照组		1 237 ± 136	1 807 ± 274	961 ± 91	1 099 ± 45	1 279 ± 76	1 384 ± 84	1 491 ± 51	1 056 ± 29	934 ± 87	476 ± 57

表 3 健脾生血颗粒 CHO-K1 细胞染色体畸变试验结果

组别	浓度 (μg/mL)	观察细胞数		畸变细胞数		畸变率 (%)	
		+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9
健脾生血颗粒	26	200	200	7	7	3.5	3.5
	130	200	200	8	6	4.0	3.0
	650	200	200	7	8	3.5	4.0
纯水对照组	0	200	200	8	5	4.0	2.5
DMSO 对照组	0	200	200	6	7	3.0	3.5
阳性对照组 (环磷酰胺)	20	200	-	28	-	14.0 *	-
阳性对照组 (甲磺酸乙酯)	0.25 (μL/mL)	-	200	-	32	-	16.0 *

注：与纯水对照组比较，* $P < 0.05$ 。

表 4 健脾生血颗粒对小鼠骨髓细胞微核率的影响

组别	动物数量 (24 h/48 h)	PCE (24 h/48 h)	MNPCE (24 h/48 h)	MPCE (%) (24 h/48 h)
健脾生血颗粒低剂量组	6/6	12 000/12 000	51/53	4.3 ± 0.4/4.4 ± 0.4
健脾生血颗粒中剂量组	6/6	12 000/12 000	54/52	4.5 ± 0.4/4.3 ± 0.4
健脾生血颗粒高剂量组	6/6	12 000/12 000	53/54	4.4 ± 0.7/4.5 ± 0.7
阴性对照组	6	12 000	46	3.8 ± 0.4
阳性对照组	6	12 000	177	14.8 ± 1.3 **

注：与阴性对照组比较，** $P < 0.01$ 。

3 讨论

健脾生血颗粒成分主要为党参、茯苓、白术、甘草、黄芪、山药、鸡内金、龟甲、麦冬、南五味子、龙骨、牡蛎、大枣、硫酸亚铁等,无毒性药材,并且多为药食两用药材。从成分分析,该产品几无毒性作用,仅硫酸亚铁可能会引起胃肠道不适^[8]。张峰等^[9]对硫酸亚铁主要不良反应进行了研究,提示其可能具有的胃肠道刺激作用(包括恶心、口腔异味、腹泻等)。当然,其不良反应与服用剂量有关,剂量越大,发生不良反应的概率越高。此外,硫酸亚铁的不良反应还与联合用药或产品组方也有关,戴琼^[10]通过比较健脾生血颗粒(原健脾生血冲剂)与硫酸亚铁颗粒的胃肠道刺激作用,发现前者不良反应远低于后者,其中药部分具有健脾和胃之功,同时还可以降低硫酸亚铁与胃肠壁持续接触的机会,从而降低不良反应的发生率。以上主要基于健脾生血颗粒的一般毒性作用进行分析,本试验则从另一方面证实,该产品未见遗传毒性作用,进一步验证了该产品的安全性,为该产品在临床上各类贫血患者人群的安全应用提供参考。

参考文献

- [1]孙艳.健脾生血颗粒治疗婴幼儿缺铁性贫血50例临床观察[J].中国现代医生,2015,8(3):127-129.
- [2]赖鹏程,沈朝霞.健脾生血颗粒治疗小儿缺铁性贫血临床研究[J].儿科药学杂志,2014,20(4):36-38.
- [3]白婧.妊娠合并贫血64例临床诊治分析[J].中国实用医药,2014,9(2):137-138.
- [4]王永炎,王志飞,谢雁鸣.以再评价为契机的中药上市后系统研究[J].中国中药杂志,2014,39(18):3421-3423.
- [5]吴彦,邸莎,李贤煜,等.银菘香的急性毒性及致突变性研究[J].中国药物警戒,2016,13(6):321-324,337.
- [6]田逸君,郑怡文,朱玉平,等.雷公藤内酯醇的遗传毒性评价[J].药学实践杂志,2016,34(3):215-218.
- [7]吴露露,汪岱迪,宗卫峰,等.木糖醇的小鼠骨髓细胞微核试验[J].海峡药学,2016,28(4):32-33.
- [8]周惠琴,周慧霞.缺铁性贫血补铁的给药方法与疗效及不良反应临床观察[J].航空航天医学杂志,2013,24(7):834-835.
- [9]张峰,张玲.用不同剂量的硫酸亚铁治疗小儿缺铁性贫血的效果研究[J].当代医药论丛,2015,13(16):132-133.
- [10]戴琼.健脾生血冲剂与硫酸亚铁治疗缺铁性贫血比较[J].医药导报,2003,22(1):51-52.

(2016-12-05 收稿 责任编辑:王明)

2017年肝胆病学术年会暨第二十六次全国中西医结合肝病学术会议、第十八次全国中医肝胆病学术会议、世界中医药学会联合会第七届肝病学术会议征文通知(第一轮)

由中国中西医结合学会肝病专业委员会、中华中医药学会肝胆病分会、世界中医药学会联合会肝病专业委员会联合举办的2017年肝胆病学术年会拟于2017年6月1-3日在福建省福州市召开。会议将以常见慢性肝胆疾病(慢性病毒性肝炎、肝纤维化、肝硬化、肝癌、脂肪性肝病、酒精性肝病)的中西医结合防治研究进展和临床经验总结为重点展开交流与讨论,并将邀请国内知名专家做特邀报告。参会代表将获国家级继续教育学分。

征文要求:

(1)提交500-1000字中英文摘要。摘要须按照“目的、方法、结果、结论”格式撰写,用于会刊印刷(注意结果中提供重要的数据资料)。另提交中文论文全文(用于评审优秀论文)。写明作者姓名、单位名称、电子邮箱、地址及邮编。通过电子邮件发送至zgzyxjhgboxh@126.com。本次征文不接受纸质文稿。

(2)投稿论文文本格式如下:中文标题用黑体、小四号字体,作者姓名及单位用楷体小五,正文宋体五号,1.5倍行距,英文及数字用Times New Roman字体。

(3)已在学术刊物公开发表过的论文,不再受理。

(4)征文截稿日期:2017年3月31日。

大会组织:

大会主席:叶永安 刘平 李秀惠(按姓氏笔划排序)

会议筹备组联系人:甘大楠 13811370013、张华 13524968650

胡建华 18600504924。

欢迎肝病防治领域的广大临床和科研工作者踊跃投稿!

中国中西医结合学会肝病专业委员会

中华中医药学会肝胆病分会

世界中联肝病专业委员会

2017年01月06日