

· 研究报告 ·

益母草碱对胚胎-胎仔发育毒性和遗传毒性的评价

田逸君¹, 朱玉平¹, 马玺里¹, 严朗¹, 滕吕纶贵子², 郑怡文¹ (1. 海军军医大学海军医学系卫生毒理学教研室, 上海 200433; 2. 复旦大学药学院, 上海 200433)

[摘要] 目的 检测益母草碱的发育毒性和遗传毒性。方法 在SD孕鼠妊娠第6~15天经口灌胃给予500、1 000和2 000 mg/kg体重的益母草碱,同时设溶媒对照组,经口灌胃0.5% CMC-Na溶液。妊娠第20天剖杀孕鼠,分析其生殖毒性。分别采用反映基因突变的鼠伤寒沙门菌回复突变试验(Ames试验)、反映染色体畸变的细胞染色体畸变试验(体外培养CHO)和ICR小鼠骨髓微核试验(体内)检测益母草碱的遗传毒性。结果 在500、1 000和2 000 mg/kg剂量益母草碱的作用下孕鼠的增重与对照组相比,差异均无统计学意义;各受试剂量组孕鼠各项指标与对照组相比,差异均无统计学意义;各剂量组胎鼠各类指标与溶媒对照组相比,无明显差异。Ames试验结果提示:在0.5、5、50、500、5 000 μg/皿受试剂量下,在有或无代谢活化S9系统时,与溶媒对照组相比,受试物对组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门菌(TA97、TA98、TA100、TA102及TA1535)所诱发的回复突变菌落数均相近。染色体畸变试验结果显示:250、500和1 000 μg/ml 3个剂量的受试物,对有无代谢活化系统S9培养的CHO细胞的染色体畸变率无明显影响。微核试验显示100、500和2 000 mg/kg各个剂量组对ICR小鼠的微核诱发率与溶媒对照组比较均无显著差异($P>0.05$)。结论 益母草碱在500、1 000和2 000 mg/kg剂量下未观察到明显的母体毒性、胚胎毒性、胎儿毒性和致畸作用。益母草碱对鼠伤寒沙门菌无致突变性,对哺乳动物培养细胞的染色体无致畸变作用,对ICR小鼠无诱发骨髓嗜多染红细胞微核的效应。上述结果表明在本试验条件下,益母草碱无发育和遗传毒性。

[关键词] 益母草碱;发育毒性;遗传毒性

[中图分类号] Q95-33

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2020)05-0451-07

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202004105

Evaluation for embryo-fetal developmental toxicity and genetic toxicity of leonurine

TIAN Yijun¹, ZHU Yuping¹, MA Xili¹, YAN Lang¹, SHENGLÜ Lunguizi², ZHENG Yiwen¹ (1. Department of Hygiene and Toxicology, Department of Naval Medicine, Naval Medical University, Shanghai 200433; 2. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200433)

[Abstract] **Objective** To evaluate the developmental toxicity and genotoxicity of leonurine. **Methods** Leonurine was given orally to SD pregnant rats on the 6th to 15th day of pregnancy at the dose of 500, 1 000 and 2 000 mg/kg body weight. The control group received 0.5% CMC-Na solution orally. Pregnant rats were sacrificed on the 20th day of pregnancy to analyze the reproductive toxicity. Ames test, in vitro chromosomal aberration test of CHO cell and in vivo micronucleus assay were performed to investigate the genotoxicity of leonurine. **Results** There was no difference statistically in weight gain of pregnant mice between two groups at the dose of 500, 1 000 and 2 000 mg/kg of motherwort alkaloids. In vitro CHO cell chromosomal aberration test indicated that there was no statistical difference between leonurine groups (doses of 250, 500 and 1 000 μg/ml) and the solvent control group with and without metabolic activation system S9. The number of micronuclei in ICR mice did not increase ($P>0.05$) in the mouse bone marrow micronucleus test at the doses of 100, 500 and 2 000 mg/kg. **Conclusion** No significant maternal toxicity, embryo toxicity, fetal toxicity and teratogenic effects were observed with leonurine at 500, 1 000 and 2 000 mg/kg doses. Leonurine was not genotoxic in Salmonella typhimurium reverse mutation test, in vitro CHO cells chromosome aberration test or mouse bone marrow micronucleus test. It showed that leonurine had no developmental toxicity and genotoxicity under the conditions of the experiment.

[Key words] leonurine; developmental toxicity; genotoxicity

[作者简介] 田逸君, 硕士, 实验师, 研究方向: 药物安全性评价研究, 特殊毒理方向, Email: yijun_tian@163.com

[通讯作者] 郑怡文, 博士, 讲师, Email: yiwenzheng@sina.com, Tel: (021)81871027

益母草(*Leonurus japonicus* Houtt.)作为传统中药,以往主要用于治疗妇产科疾病。近年来的研究发现,益母草中的主要化学成分为生物碱、类黄酮和二萜等^[1],其中,益母草碱(4-胍基-正丁基-丁香酸酯,又名 SCM-198)是一种具有抗血小板聚集^[2]、改善微循环、保护心肌^[3-4]等多种生物活性的重要生物碱,有广泛的临床应用前景^[5-7]。本研究采用 SD 大鼠胚胎-胎仔发育毒性试验方法对益母草碱的致畸性进行评价;同时采用 Ames 试验、体外 CHO 细胞染色体畸变试验和小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验这 3 个标准试验组合的方法,分别从体外到体内,从微生物、离体真核细胞到整体动物水平系统检测其致突变性^[8-9],旨在为临床安全用药提供参考。

1 材料

1.1 受试物

益母草碱(含量 99.09%,复旦大学药学院,批号:20110329)。使用前以 0.5% CMC-Na 溶液配制成混悬液,供试;羧甲基纤维素钠(CMC-Na,批号:F20100420,国药集团化学试剂有限公司);DMSO(批号:T20101110,国药集团化学试剂有限公司);丝裂霉素 C(批号:101202,浙江海正药业股份有限公司);环磷酰胺(批号:10110621,江苏恒瑞药业股份有限公司);敌克松(批号:PS-262)、甲基磺酸甲酯(批号:129925)、4-硝基喹啉-N-氧化物(批号:N8141)、2-氨基苄(批号:A5550-0)、1,8-二羟基蒽醌(批号:S52075-139)均购自 Sigma 公司;大鼠肝微粒体酶 S9(批号:2715,美国 Moltox 公司);组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门菌共 5 支,分别为 TA97、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 菌株,由国家上海新药安全性评价中心赠予,储存于液氮中。中国仓鼠卵巢(CHO)细胞由复旦大学公共卫生学院毒理教研室赠予,储存于液氮中。

1.2 试验动物

SD 大鼠(SPF 级),雌性 100 只,雄性 80 只。雌鼠 5~6 周龄,体重 110~140 g;雄鼠 6~7 周龄,体重 150~180 g(上海西普尔-必凯实验动物有限公司);实验动物质量合格证号:2008001629237。ICR 小鼠(SPF 级),共 46 只,雌雄各半。雌鼠 7~8 周龄,体重 21~23 g;雄鼠 7~8 周龄,体重 23~25 g(上海西普尔-必凯实验动物有限公司);实验动物质量合格证号:2008001610906。实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2008-0016,实验动物使用许可证号:SYXK(沪)2007-0003。

2 方法

2.1 胚胎-胎鼠发育毒性试验

按《药物生殖毒性研究技术指导原则》^[10-11]的要求,将雌鼠与雄鼠 1:1 合笼,交配第 2 天起对雌鼠进行阴道涂片检查,若显微镜下查见精子则视为交配成功,成功当天即为妊娠 GD₀。然后将这部分雌鼠按体重随机分为 4 组,每组 20 只。急性毒性试验结果提示 SD 大鼠经口灌胃给予益母草碱,最大耐受量(MTD)>5 000 mg/kg,因此,本试验设高、中、低剂量组(2 000、1 000 和 500 mg/kg 体重),另设溶媒对照组,分别对不同组别的雌鼠连续灌胃给药 10 d(给药起止时间为 GD₆~GD₁₅)。于 GD₀、GD₅、GD₆~GD₁₅ 和 GD₂₀ 时称取孕鼠的体重。在 GD₂₀ 时处死孕鼠,观察外观是否异常,同时记录其活胎数(区分雌雄)、黄体数、着床数、死胎数等。所有的胎鼠,取其中约一半数量固定于 Bouin 液中作内脏检查,另一半固定于 75% 乙醇中制作骨骼标本,用于骨骼畸形检查。

2.2 遗传毒性试验

按《药物遗传毒性研究技术指导原则》^[12-13]的要求,分别应用反映基因突变的 Ames 试验^[14]、反映染色体畸变的染色体畸变试验(体外培养 CHO 细胞)^[15]和小鼠微核试验(体内)^[16]方法。

2.2.1 Ames 试验

应用 TA97、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 这 5 支菌株,设 5 个剂量组(5 000、500、50、5、0.5 μg/皿),此外还设空白对照、溶媒对照和阳性对照组,每个剂量组及对照组均设 3 个平行皿(具体剂量见表 1)。采用标准平板掺入法,使细菌在有或无代谢活化系统 S9 的条件下接触受试物,并用最低极限的琼脂培养基培养 48~72 h 后,先用显微镜观察皿上的菌苔生长情况,确定受试物无明显的抑菌或杀菌作用,再人工计数每皿回复突变的菌落数,记录原始数据,并计算每组的均值和标准差,与溶媒对照组进行比较^[8,17-18]。重复试验一次。

2.2.2 染色体畸变试验

在有或无代谢活化系统 S9 的条件下,在体外培养的 CHO 细胞中加入对应的不同浓度的受试物或对照品,反应体系总体积为 10 ml。高、中、低剂量组受试物终浓度依次为 1 000、500 和 250 μg/ml,阳性对照组丝裂霉素 C 和环磷酰胺的终浓度分别为 0.5、60 μg/ml,另设溶媒对照组分别作用于细胞 4 h 后换液,继续培养至 24 h,最后收集细胞。用秋水仙碱处理所有细胞,将细胞终止在有丝分裂中期,

表1 阳性对照品的名称及剂量

菌株	无代谢活化系统(-S9)				有代谢活化系统(+S9)			
	阳性对照品名称	加入量(μl/皿)	配制浓度(μg/ml)	终浓度(μg/皿)	阳性对照品名称	加入量(μl/皿)	配制浓度(μg/ml)	终浓度(μg/皿)
TA97	敌克松	100	500.0	50.0	2-氨基苄	100	100.0	10.0
TA98	敌克松	100	500.0	50.0	2-氨基苄	100	100.0	10.0
TA100	甲基磺酸甲酯	100	10.0	1.0	2-氨基苄	100	100.0	10.0
TA102	甲基磺酸甲酯	100	10.0	1.0	1,8-二羟基蒽醌	100	500.0	50.0
TA1535	4-硝基喹啉-N-氧化物	100	5.0	0.5	环磷酸胺	100	500.0	50.0

经 0.75% 氯化钾低渗、1:3 醋酸甲醇固定、滴片和 Giemsa 染色后,在显微镜下计数和观察染色体的数量或结构是否改变^[8, 17-18]。

观察对象的选择为染色体分散良好、数目完整的中期分裂相细胞,采用盲法读片,受试物及溶媒对照组每组观察 200 个细胞,阳性对照组观察 100 个细胞,计数染色体或染色单体的断裂、缺失及其他类型结构异常的数目^[8, 17-18](裂隙和核内复制一般不作为畸变类型),计算畸变率。

2.2.3 骨髓微核试验

受试物采用经口灌胃的方式(与临床给药途径一致)给药,急性毒性试验结果提示 ICR 小鼠经口灌胃给予益母草碱,MTD>5 000 mg/kg,故高、中、低剂量分别设为 2 000、1 000 和 500 mg/kg 体重,同时设溶媒对照及阳性对照组。给药容积为 10 ml/kg 体重。以 40 mg/kg 体重的剂量腹腔注射给予环磷酸胺(阳性对照),给药容量为 10 ml/kg 体重。溶媒对照组以 10 ml/kg 体重的容积经口灌胃给予 0.5% CMC-Na 溶液。小鼠在给药 24 h 后处死,每只动物取其两侧股骨骨髓,制 2 张涂片,用甲醇固定,然后用 pH6.8 的 Giemsa 染液进行染色。

每只小鼠镜检 1 000 个骨髓嗜多染红细胞(PCE),计数含微核的 PCE 数(MNPCE),计算微核发生率,同时记录 200 个 PCE 计数过程中观察到的正染红细胞(NCE)的数目,并计算 PCE/NCE 值,以评价受试物是否有骨髓毒性^[8, 17-18]。

3 统计分析^[8, 17-18]

3.1 胚胎-胎鼠发育毒性试验

使用分析软件 SPSS11.0,计量指标采用($\bar{x} \pm s$)表示,各组之间的比较采用方差分析,率的比较采用 χ^2 检验。

3.2 Ames 试验

比较受试物各剂量组与溶剂对照组的回复突变菌落数,若某剂量组回复突变菌落数为溶剂对照

组的 2 倍以上,呈现可重复性,并在一定的剂量范围内存在剂量-反应关系,则判断为阳性。

3.3 染色体畸变试验

染色体畸变细胞的发生率须与溶媒对照组进行比较分析后方可判定,>10% 者判为阳性。

3.4 骨髓微核试验

采用 χ^2 检验比较给药组与对照组之间的差异是否具有统计学意义。

4 结果

4.1 胚胎-胎鼠发育毒性结果

益母草碱各受试剂量作用下在给药期间(GD₆~GD₁₅)、停药后(GD₁₅~GD₂₀)以及整个孕期(GD₀~GD₂₀)孕鼠的增重与对照组相比,差异均无统计学意义;各受试剂量组子宫连胎重量、子宫重量、黄体数、着床率、每窝平均活胎数、死胎数和吸收胎数、活胎率、死胎发生率、吸收胎发生率与对照组相比,差异均无统计学意义;此外,各组胎鼠均未观察到内脏和外观畸形的发生。以上研究结果提示,益母草碱在各受试剂量下未观察到明显的母体毒性、胚胎毒性和致畸作用。

由表 2 可见,受试物各剂量组胎鼠的体重、身长、胎盘重量及性别比例与溶媒对照组相比无明显差异,提示益母草碱在各受试剂量下未观察到明显的胎儿毒性。

由表 3~5 可见,受试物各剂量组胎鼠观察指标

表 2 益母草碱对胎鼠生长发育的影响

观察指标	溶媒对照组	益母草碱组(mg/kg体重)		
		500	1 000	2 000
受检胎鼠数(只)	184	174	160	168
性别比例(雄:雌)	93 : 91	81 : 93	80 : 80	88 : 80
活胎体重($\bar{x} \pm s$, g)	3.28±0.40	3.25±0.40	3.30±0.40	3.31±0.46
胎盘重($\bar{x} \pm s$, g)	0.56±0.08	0.55±0.09	0.56±0.08	0.55±0.09
活胎身长($\bar{x} \pm s$, cm)	3.60±0.18	3.57±0.20	3.57±0.21	3.61±0.22

的数目及发育程度与溶媒对照组相比无明显差异,提示益母草碱在各受试剂量下对胎鼠骨骼的发育未见明显影响。

4.2 Ames 试验结果

受试物各剂量组和对照组的平皿通过肉眼观察均未见污染,并且在显微镜下可见背景菌苔生长。试验结果见表6、表7,5个菌株的自发回复突变菌落数以及阳性对照品诱发的回复突变菌落数均在历史对照范围内,并且各菌株阳性对照组的回复突变菌落数与空白对照组相比显著增加,提示本试验系统符合试验要求。在最高剂量已达到5000 μg/ml的受试条件下,未观察到受试物的抑菌现象^[8,17-19]。各剂量组受试物在有或无代谢活化系统S9的条件下,对5支菌株所诱发的回复突变菌落数均与溶媒

对照组的突变菌落数相近,并且未观察到明显的剂量-反应关系(表8)。

4.3 染色体畸变试验结果

阳性对照组能够诱发受试细胞染色体的畸变率明显增高,24 h在有或无代谢活化系统S9的情况下,染色体畸变率分别为17%和18%,均>10%,为阳性结果;溶媒对照品以及250、500和1000 μg/ml受试物在24 h、有S9组的染色体畸变率分别为1.5%、1.0%、0.5%和1.5%;24 h、无S9组的染色体畸变率分别为1.0%、1.0%、1.5%和0.5%,综上,溶媒对照组及受试物各剂量组细胞染色体畸变率均小于5%,为阴性结果^[8,17-18]。

4.4 小鼠骨髓微核试验的结果

各剂量组小鼠在给药后均未见异常。微核试验阅片结果见表9。益母草碱在各受试剂量下未

表3 益母草碱对胎鼠骨骼发育的影响

观察指标	溶媒对照组	益母草碱组(mg/kg体重)		
		500	1000	2000
受检胎鼠数(只)	88	85	77	78
颈椎数	7.0±0.0	7.0±0.0	7.0±0.0	7.0±0.0
胸椎数	13.0±0.0	13.0±0.0	13.0±0.0	13.0±0.0
腰椎数	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0
尾椎	2.3±0.6	2.3±0.7	2.4±0.6	2.4±0.6
骶椎数	5.5±0.6	5.5±0.6	5.6±0.6	5.5±0.5
肋骨数	13.0±0.0	13.0±0.0	13.0±0.0	13.0±0.0
胸骨节数	4.7±1.1	4.6±1.1	5.0±1.2	4.7±1.0
掌骨数	7.3±1.0	7.3±1.0	7.5±0.9	7.0±1.0
近端指骨数	0.1±0.4	0.3±1.1	0.2±0.9	0.3±1.0
远端指骨数	9.9±0.4	10.0±0.2	9.9±0.4	10.0±0.2
跖骨数	8.0±0.2	8.0±0.2	7.9±0.4	8.0±0.0
近端跖骨数	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
远端跖骨数	10.0±0.3	10.0±0.2	9.9±0.4	10.0±0.0

表4 益母草碱对胎鼠枕骨发育的影响

枕骨分级	溶媒对照组	益母草碱组(mg/kg体重)		
		500	1000	2000
受检胎鼠数(只)	88	85	77	78
I级枕骨数[n(%)]	27(30.7)	25(29.4)	31(40.3)	29(37.2)
II级枕骨数[n(%)]	60(68.2)	59(69.4)	45(58.4)	49(62.8)
III级枕骨数[n(%)]	1(1.1)	1(1.2)	1(1.3)	0(0)
IV级枕骨数[n(%)]	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

表5 益母草碱对胎鼠胸骨节骨骼发育的影响

观察指标	溶媒对照组	益母草碱组(mg/kg体重)		
		500	1000	2000
受检胎鼠数(只)	88	85	77	78
胸骨节数	4.7±1.1	4.6±1.1	5.0±1.2	4.7±1.0
骨化不全数	0.7±0.8	0.5±0.6	0.7±0.7	0.8±0.7
未骨化数	1.4±1.1	1.4±1.1	1.0±1.2	1.3±1.0

表6 益母草碱对5支菌株的回变菌落数试验结果(个/皿, $\bar{x} \pm s$) (第1次)

组别(μg/ml)	TA97		TA98		TA100		TA102		TA1535	
	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9
5000	84±5	70±3	50±3	53±7	86±8	74±3	203±42	193±62	11±4	12±5
500	85±10	79±8	32±9	44±5	91±18	77±13	213±80	174±11	9±3	8±2
50	76±8	71±6	37±5	40±10	72±3	82±15	196±24	184±13	9±1	9±3
5	92±12	81±1	33±4	34±7	87±18	69±13	218±50	176±8	9±2	9±2
0.5	86±25	71±8	37±6	38±9	82±8	80±9	176±48	159±16	10±4	8±2
空白对照组	77±5	75±6	35±12	42±11	90±14	77±13	207±50	194±25	12±7	10±3
溶媒对照组	75±13	77±6	40±14	52±4	90±9	88±11	178±62	172±40	13±3	13±1
阳性对照组	745±49	1067±176	467±115	711±87	578±61	486±34	636±41	634±32	467±82	433±15

观察到对小鼠骨髓的抑制作用,溶媒对照组雌性和雄性小鼠骨髓的PCE微核发生率分别为4.09%和2.94%,阳性对照组雌性和雄性小鼠骨髓PCE微核发生率分别为15.93%和16.28%,与溶媒对照组相比,差异均有统计学意义,受试物在500、1 000、2 000 mg/kg剂量下对雌性ICR小鼠骨髓PCE微

表7 益母草碱对5支菌株的回变菌落数(个/皿, $\bar{x} \pm s$) (第2次)

组别($\mu\text{g}/\text{ml}$)	TA97		TA98		TA100		TA102		TA1535	
	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9
5 000	83±7	80±9	32±4	33±8	94±16	93±7	211±13	196±18	9±2	9±6
500	79±11	79±10	26±4	30±6	78±5	79±7	208±6	195±7	9±1	10±3
50	74±13	74±11	32±4	31±3	95±27	86±8	187±9	195±42	8±2	11±2
5	86±6	79±16	31±4	35±5	83±10	85±14	179±4	177±62	9±1	7±2
0.5	84±9	85±7	26±6	27±2	110±20	91±11	190±1	186±18	8±2	12±5
空白对照组	76±5	80±14	32±6	30±11	88±2	102±10	212±6	176±46	10±2	8±1
溶媒对照组	83±3	79±12	29±3	37±11	84±2	89±9	192±15	184±33	8±2	10±2
阳性对照组	807±5	806±90	934±64	851±163	446±40	496±21	623±23	621±37	480±35	476±53

表8 益母草碱对24 h体外培养CHO细胞的染色体畸变试验结果(加或不加S9系统)

组别($\mu\text{g}/\text{ml}$)	观察细胞数(个)	各类染色体畸变数								畸变细胞数(个)	畸变率(%)	
		断裂	断片	双着丝粒	三辐体	四辐体	碎片或微小体	环状	多倍体			
250	+S9	200	2	0	0	0	0	0	0	0	2	1.0
	-S9	200	2	0	0	0	0	0	0	0	2	1.0
500	+S9	200	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.5
	-S9	200	8	0	0	0	0	0	0	0	3	1.5
1 000	+S9	200	5	0	1	0	0	0	0	0	3	1.5
	-S9	200	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.5
溶媒对照组	+S9	200	2	0	1	0	0	0	0	0	3	1.5
溶媒对照组	-S9	200	2	0	0	0	0	0	0	0	2	1.0
阳性对照组	+S9	100	20	0	0	2	0	0	0	0	17	17*
阳性对照组	-S9	100	18	3	0	0	1	0	0	0	18	18*

* $P < 0.05$, 与溶媒对照组比较。

表9 益母草碱对小鼠骨髓嗜多染红细胞的微核效应试验结果

组别(mg/kg体重)	性别	动物数(只)	观察PCE数(个)	PCE/NCE($\bar{x} \pm s$)	微核率($\bar{x} \pm s, \%$)
500	雌	5	5 126	1.17±0.17	2.53±1.48
	雄	5	5 109	1.14±0.24	0.78±0.81*
1 000	雌	5	5 076	1.19±0.21	2.16±1.28
	雄	5	5 093	1.42±0.14	0.79±1.30*
2 000	雌	5	5 117	1.15±0.11	2.17±1.47
	雄	5	5 088	1.15±0.20	2.96±2.43
溶媒对照组	雌	5	5 131	1.07±0.03	4.09±1.88
	雄	5	5 109	1.15±0.11	2.94±0.98
阳性对照组	雌	5	5 019	1.25±0.09	15.93±7.50*
	雄	5	5 039	1.27±0.16	16.28±3.80*

* $P < 0.05$, 与溶媒对照组比较。

核诱发率分别为 2.53%、2.16%和 2.17%，对雄性 ICR 小鼠骨髓 PCE 微核诱发率分别为 0.78%、0.79%和 2.96%，由上述结果可见，受试物各剂量组均未诱发 ICR 小鼠骨髓 PCE 微核率的明显增高^[8, 17-18, 20]。

5 讨论

益母草作为传统中药，其应用广泛且历史悠久，主要用于治疗月经不调、痛经、恶露等妇科疾病，同时还用于消肿化瘀、排水利尿。而现代医学已证明益母草中的生物碱——益母草碱在其中发挥了主要功效，益母草碱具有溶栓、抗凝、降低血脂和血液黏度、抑制红细胞和血小板聚集^[2]等多种功能，对改善微循环、抗自由基活性和减少细胞内钙超载^[3-4]也有显著作用。上述功能有助于预防心血管疾病和脑血管疾病，抑制心肌纤维化^[7]、改善认知、促进神经元修复^[21]、抗炎^[22]、防治糖尿病^[23]等，因此，益母草碱在心脑血管、代谢病、肾病、生殖^[24]等临床研究领域有相当广泛的应用前景^[5-7]。进行安全性评价是药物研发和安全使用的重要环节，但目前对益母草碱的基础毒性和特殊毒性的研究尚未见相关文献报道。研究其遗传毒性和生殖毒性对于临床安全用药具有重要的指导意义。

本研究采用国际通用的研究方法，对益母草碱的生殖毒性和遗传毒性进行了系统的评价。在胚胎-胎仔发育毒性研究中，自大鼠胚胎着床至硬腭闭合这个阶段孕鼠口服益母草碱，通过观察受试物对妊娠动物、胚胎及胎仔发育的影响检测其致畸性。药物遗传毒性的研究根据国家相关标准，必须遵循原核生物与真核生物、体内系统与体外系统相结合的原则进行，本研究采用 Ames 试验、体外 CHO 细胞染色体畸变试验和小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验三者标准组合方案，其检测范围涵盖了基因突变、染色体结构和数目畸变等多个遗传学终点。Ames 试验用于检测 DNA 损伤引起的基因突变，组氨酸营养缺陷型(his-)鼠伤寒沙门菌在受到诱变剂作用后会大量回复突变，可自行合成组氨酸，形成肉眼可见的菌落。某些化学物质需经代谢活化后才具有致突变作用，因此，在测试系统中又设置了平行组加入哺乳动物微粒体酶，以弥补体外试验缺乏代谢活化系统的不足。染色体畸变试验常用于检测化合物是否引起细胞染色体结构和数目的改变。诱变因素在损伤染色体的同时也可能损伤纺锤体，从而导致染色体的丢失并形成微核，应用微核试验检测染色体或有丝分裂器的损伤，具有直观、简便等优势^[9]。

研究结果显示，在本试验剂量条件下，益母草碱未观察到明显的胚胎-胎仔发育毒性以及遗传毒性，该结论可为益母草碱在临床上的安全使用提供参考和指导，有助于降低用药风险。

【参考文献】

- [1] SHANG X F, PAN H, WANG X Z, et al. *Leonurus japonicus* Houtt.: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 152(1): 14-32.
- [2] Kuang P G, Zhou X F, Zhang F Y, et al. Motherwort and cerebral ischemia[J]. *J Tradit Chin Med*, 1988, 8: 37-40.
- [3] LIU X H, XIN H, HOU A J, et al. Protective effects of leonurine in neonatal rat hypoxic cardiomyocytes and rat infarcted heart[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2009, 36(7): 696-703.
- [4] LIU X H, CHEN P F, PAN L L, et al. 4-Guanidino-n-butyl syringate (Leonurine, SCM 198) protects H9c2 rat ventricular cells from hypoxia-induced apoptosis[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2009, 54(5): 437-444.
- [5] FISKUM G, ROSENTHAL R E, VERECZKI V, et al. Protection against ischemic brain injury by inhibition of mitochondrial oxidative stress[J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2004, 36(4): 347-352.
- [6] LIU X H, PAN L L, CHEN P F, et al. Leonurine improves ischemia-induced myocardial injury through antioxidative activity[J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(10): 753-759.
- [7] LIU X H, PAN L L, DENG H Y, et al. Leonurine (SCM-198) attenuates myocardial fibrotic response via inhibition of NADPH oxidase 4[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 54: 93-104.
- [8] 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.
- [9] 田逸君, 朱玉平, 朱江波, 等. 草苳虫内酯的遗传毒性评价[J]. *癌变畸变突变*. 2012, 24(4): 309-312.
- [10] 国家食品药品监督管理总局. 药物生殖毒性研究技术指导原则[EB/OL]. 2007. <https://wenku.baidu.com/view/a9f9c49af78a6529647d5391.html>.
- [11] OECD. Test Guidance 414. Prenatal Developmental Toxicity Study. In: OECD Guidance for Testing of Chemicals[S]. Paris: Organization for Economic Cooperation & Development, 2001.
- [12] 国家食品药品监督管理总局. 药物遗传毒性研究技术指导原则[EB/OL]. 2007. <https://wenku.baidu.com/view/2e1f1b1985868762caaedd3383c4bb4cf7ecb7a6.html>.
- [13] 周海钧主译. ICH 药品注册的国际技术要求(安全性部分)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 37-61.
- [14] OECD. Test Guidance 471. Bacterial Reverse Mutation Test. In: OECD Guidance For Testing of Chemicals.[S] Paris: Organization for Economic Cooperation & Development, 1997.
- [15] OECD. Test Guidance 474. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. In: OECD Guidance for Testing of Chemicals[S]. Paris: Organization for Economic Cooperation & Development, 1997.
- [16] OECD. Test Guidance 473. In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test. In: OECD Guidance for Testing of Chemicals[S]. Paris: Organization for Economic Cooperation &

- Development, 1997.
- [17] 田逸君. 雷公藤内酯醇的遗传毒性研究[D]. 第二军医大学, 2016.
- [18] 田逸君, 张天宝, 朱玉平, 等. 聚乙二醇修饰降纤酶的遗传毒性评价[J]. 中国新药与临床杂志, 2012, 31(5): 281-284.
- [19] 张培培, 苏敏, 崔佳丽, 等. HPLC-MS/MS法测定Beagle犬血浆中灯盏乙素酶解产物灯盏乙素苷元[C]. 2016年第六届全国药物毒理学年会论文集, 2016.
- [20] 严婷. 纤溶活性化合物FGFC1的药效学和毒理学的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.
- [21] HONG Z Y, YU S S, WANG Z J, et al. SCM-198 ameliorates cognitive deficits, promotes neuronal survival and enhances CREB/BDNF/TrkB signaling without affecting $\alpha\beta$ burden in A β PP/PS1 mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(8): 18544-18563.
- [22] SONG X J, WANG T C, ZHANG Z C, et al. Leonurine exerts anti-inflammatory effect by regulating inflammatory signaling pathways and cytokines in LPS-induced mouse mastitis[J]. *Inflammation*, 2015, 38(1): 79-88.
- [23] HUANG L Q, YANG X, PENG A L, et al. Inhibitory effect of leonurine on the formation of advanced glycation end products[J]. *Food Funct*, 2015, 6(2): 584-589.
- [24] 梁博志, 罗建华, 杨冬花, 等. 益母草碱作用及机制研究进展[J]. 贵阳中医学院学报, 2017, 39(4): 93-96.
- [收稿日期] 2020-04-21 [修回日期] 2020-06-28
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 446 页)

- [3] CHATEL M A, LARKIN D F. Sirolimus and mycophenolate as combination prophylaxis in corneal transplant recipients at high rejection risk[J]. *Am J Ophthalmol*, 2010, 150(2): 179-184.
- [4] POUTON C W. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2006, 29(3-4): 278-287.
- [5] RICCIUTELLI M, DI MARTINO P, BARBONI L, et al. Evaluation of rapamycin chemical stability in volatile-organic solvents by HPLC[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 41(3): 1070-1074.
- [6] BALAKRISHNAN P, LEE B, OH D H, et al. Enhanced oral bioavailability of dexibuprofen by a novel solid Self-emulsifying drug delivery system (SEDDS)[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, 72(3): 539-545.
- [7] CHO H Y, CHOI J H, OH I J, et al. Self-emulsifying drug delivery system for enhancing bioavailability and lymphatic delivery of tacrolimus[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2015, 15(2): 1831-1841.
- [8] 余越, 陶春, 杨海跃, 等. 不同孔径介孔二氧化硅纳米粒的制备及其用于固化西罗莫司自微乳[J]. 药学学报, 2017, 52(6): 985-991.
- [9] HU X W, LIN C, CHEN D X, et al. Sirolimus solid self-microemulsifying pellets: formulation development, characterization and bioavailability evaluation[J]. *Int J Pharm*, 2012, 438(1-2): 123-133.
- [10] 吴昊, 宋洪涛. 西罗莫司纳米结构脂质载体分散液的制备及其体外释放度考察[J]. 药学实践杂志, 2012, 30(3): 189-193.
- [11] 吴昊, 张晶, 宋洪涛. 西罗莫司纳米脂质载体固化制剂的制备[J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(7): 562-567.
- [12] 刘志宏, 胡雄伟, 张晶, 等. 西罗莫司固体自微乳化给药系统的体内外评价[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(20): 2369-2375.
- [13] 霍涛涛, 张美敬, 陶春, 等. 基于多组分评价的雷公藤提取物固体分散体的制备及体外表征[J]. 中草药, 2018, 49(1): 128-134.
- [14] SUN M H, SI L Q, ZHAI X Z, et al. The influence of co-solvents on the stability and bioavailability of rapamycin formulated in self-microemulsifying drug delivery systems[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2011, 37(8): 986-994.
- [15] 侯明明, 宋洪涛, 周欣. 免疫抑制剂药物基因组学的研究进展[J]. 中国药房, 2009, 20(31): 2471-2473.
- [16] 董文雪, 何军, 杨亚妮. 自微乳释药系统研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2011, 42(12): 948-954.
- [17] 刘建清, 张晶, 赵佳丽, 等. 纳米结构脂质载体促进难溶性药物口服吸收机制的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2014, 32(4): 254-256, 277.
- [18] 王学功. 几种 β -环糊精衍生物的合成及对药物分子的包结作用[D]. 天津: 天津大学, 2005.
- [19] 刘志宏, 胡雄伟, 陶春, 等. 西罗莫司自乳化给药系统及其固体化研究[J]. 药学实践杂志, 2016, 34(2): 142-147, 170.
- [20] GUMASTE S G, PAWLAK S A, DALRYMPLE D M, et al. Development of solid SEDDS, IV: effect of adsorbed lipid and surfactant on tableting properties and surface structures of different silicates[J]. *Pharm Res*, 2013.
- [21] LEE D H, YEOM D W, SONG Y S, et al. Improved oral absorption of dutasteride via Soluplus[®]-based supersaturable self-emulsifying drug delivery system (S-SEDDS)[J]. *Int J Pharm*, 2015, 478(1): 341-347.
- [22] 刘静. 自微乳释药系统在西药制剂中的应用[J]. 中国药业, 2018, 27(1): 4-8.
- [23] 徐晓琰, 恽菲, 狄留庆, 等. 环糊精包合药物胃肠道转运过程及机制研究进展[J]. 中草药, 2012, 43(10): 2062-2065.
- [收稿日期] 2019-10-10 [修回日期] 2020-01-03
[本文编辑] 李睿旻