



复方山莨菪碱注射液的遗传毒性评价

田逸君, 侍雯婧, 董雅春, 张天宝, 朱玉平

Evaluation on genotoxicities of raceanisodamine hydrochloride injection

TIAN Yijun, SHI Wenjing, DONG Yachun, ZHANG Tianbao, ZHU Yuping

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202206035>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

Wentilactone A的遗传毒性评价

Genotoxicity evaluation of Wentilactone A

药学实践与服务. 2020, 38(6): 533-538 DOI: [10.12206/j.issn.1006-0111.202004089](https://doi.org/10.12206/j.issn.1006-0111.202004089)

益母草碱对胚胎-胎仔发育毒性和遗传毒性的评价

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

药学实践与服务. 2020, 38(5): 451-457 DOI: [10.12206/j.issn.1006-0111.202004105](https://doi.org/10.12206/j.issn.1006-0111.202004105)

高浓度维生素B₆注射液细菌内毒素检查方法学验证

Validation of endotoxin test for high concentration vitamin B₆ injection

药学实践与服务. 2020, 38(1): 67-70 DOI: [10.3969/j.issn.1006-0111.201909108](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-0111.201909108)

正交试验法优化透肤洗剂的提取工艺

Optimization of extraction technology for Tofu irrigation by orthogonal test

药学实践与服务. 2018, 36(2): 173-175 DOI: [10.3969/j.issn.1006-0111.2018.02.016](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-0111.2018.02.016)

6种医院制剂微生物限度检查方法适用性试验研究

Validation of microbial limit test for six hospital preparations

药学实践与服务. 2019, 37(6): 527-531 DOI: [10.3969/j.issn.1006-0111.2019.06.011](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-0111.2019.06.011)

复方特比萘芬软膏微生物限度检查方法适用性试验研究

Validation of microbial limit test for compound terbinafine gel

药学实践与服务. 2019, 37(4): 357-360,369 DOI: [10.3969/j.issn.1006-0111.2019.04.014](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-0111.2019.04.014)



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

复方山莨菪碱注射液的遗传毒性评价

田逸君^a, 侍雯靖^a, 董雅春^a, 张天宝^a, 朱玉平^b (海军军医大学: a. 卫生毒理学教研室; b. 基础医学实验教学中心, 上海 200433)

[摘要] 目的 复方山莨菪碱注射液的遗传毒性研究。方法 采用细菌回复突变试验(bacterial reverse mutation test, 简称 Ames test), 体外染色体畸变试验(chromosome aberration test, 简称 CA)和体内微核试验(micronucleus test, 简称 MNT) 3个标准试验组合, 以评价复方山莨菪碱注射液的遗传毒性。结果 Ames 试验表明在所有受试剂量为 0.5、5、50、500、5 000 $\mu\text{g}/\text{皿}$, 两种平行条件下, 即有或没有 S9 代谢活化系统时, 受试物对 TA1535、TA102、TA100、TA98 及 TA97 这 5 种细菌菌株, 与溶媒对照组的突变菌落数进行比较, 各剂量组的所诱发的回复突变菌落数均与其相近。CA 试验中, 受试物设 3 个剂量组, 依次为 58.75、117.5 及 235.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 所有剂量在两种平行的系统条件下(即有或没有 S9 代谢活化系统时), 对中国仓鼠卵巢细胞(CHO 细胞)的染色体畸变率均没有显著影响。MNT 试验也设了 3 个剂量组, 分别为 7.5、15.0 及 30.0 mg/kg 。所有剂量组与溶媒对照组的微核诱发率进行比较, 对 ICR 小鼠骨髓的微核诱发率均无统计学意义($P>0.05$)。结论 在本研究条件下, 复方山莨菪碱注射液对细菌无致突变性, 对哺乳动物细胞的染色体无致畸变作用, 对啮齿类动物骨髓中的嗜多染红细胞无诱发微核的效应。所有试验结果都显示, 复方山莨菪碱注射液在本受试条件下对人体不具有潜在致癌性及遗传毒性。

[关键词] 盐酸消旋山莨菪碱; 遗传毒性; 细菌回复突变试验; 染色体畸变试验; 微核试验

[文章编号] 2097-2024(2023)01-0050-06

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202206035

Evaluation on genotoxicities of raceanisodamine hydrochloride injection

TIAN Yijun^a, SHI Wenjing^a, DONG Yachun^a, ZHANG Tianbao^a, ZHU Yuping^b (a. Department of Hygiene and Toxicology; b. Department of Experimental Teaching Center of Basic Medicine, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To study the genotoxicities of raceanisodamine hydrochloride injection. **Methods** Bacterial reverse mutation test, *in vitro* Chromosomal aberration test and *in vivo* Micronucleus test were performed to investigate the genotoxicities of raceanisodamine hydrochloride injection. **Results** The Ames test showed that raceanisodamine hydrochloride injection did not increase mutagenicity for TA1535, TA102, TA100, TA98 and TA97 strains at the dosage of 0.5, 5, 50, 500, 5 000 μg per plate under two parallel system conditions (\pm S9). Results of CA test indicated that there was no statistical difference between raceanisodamine hydrochloride injection groups (doses of 58.75, 117.5 and 235.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and the solvent control group under two parallel system conditions (\pm S9). In MNT test, with doses of 7.5, 15.0 and 30.0 mg/kg respectively, the micronucleus induction rate of bone marrow of ICR mice was not statistically significant ($P>0.05$) when compared with that of vehicle control group in all dose groups. **Conclusion** Under the conditions of these study, the results indicated that raceanisodamine hydrochloride injection had no mutagenicity to *Salmonella typhimurium*, had no aberration effect on the chromosome of mammalian cultured cells, and had no effect on inducing micronucleus of bone marrow polychromatic erythrocytes in ICR mouse. All test results showed that raceanisodamine hydrochloride injection had no potential carcinogenicities and genetic toxicities under the test conditions.

[Key words] raceanisodamine hydrochloride; genetic toxicities; bacterial reverse mutation test; chromosomal aberration test; micronucleus test

山莨菪碱是托品酸和有机碱形成的酯类, 结构与阿托品和东莨菪碱相类似, 在托品基的 6 位碳原子上有不对称的羟基, 是一种天然的莨菪烷类生物碱^[1-3]。山莨菪碱属于非选择性的毒蕈碱受体阻断

剂, 能够阻断 M1 和 M5 受体亚型。因此, 山莨菪碱有一系列类似于阿托品的药理作用^[4], 如抑制唾液分泌、抑制胃酸和汗液分泌、抑制胃肠蠕动及膀胱收缩, 其他还包括散瞳、扩张支气管等^[5], 适用于胃或肠道的绞痛、急性微循环障碍及有机磷酸中毒等临床病症^[4, 6]。但单独使用山莨菪碱用药剂量大, 故常出现口干、面红、视近物模糊、心跳加快、排尿困难等阿托品样副作用, 因此极大限制了其在

[作者简介] 田逸君, 实验师, Tel: (021)81871033; Email: tian_joy@126.com

[通信作者] 朱玉平, 正高级实验师, 研究方向: 新药临床前安全性评价, Email: zhuyuping72@hotmail.com

临床上的广泛应用。近年来,随着对山莨菪碱注射液及其衍生物药理作用的深入研究,发现其胆碱能抗炎通路对慢性炎症如风湿性关节炎、溃疡性结肠炎等慢性疾病具有较好的药效作用^[4]。但这些疾病的疗程较长,如何降低或消除山莨菪碱在治疗过程中的阿托品样副作用是临床现实问题。

新斯的明是胆碱酯酶抑制剂,进入机体后,通过可逆性抑制胆碱酯酶活性,使乙酰胆碱不能水解,从而提高体内受体部位的乙酰胆碱浓度,加强和延长乙酰胆碱的作用,呈现出全部胆碱能神经兴奋的效应^[4]。将毒蕈碱受体阻断剂和胆碱酯酶抑制剂这两类药物以适当的比例联合使用(即复方山莨菪碱)来协同激活胆碱能抗炎通路,增强其抗炎效果并降低其副作用的治疗方案,有望为临床治疗类风湿性关节炎提供新的治疗方案^[4]。

前期的研究结果显示:通过将盐酸消旋山莨菪碱与甲硫酸新斯的明组合制备而成的复方山莨菪碱注射液不仅对类风湿性关节炎具有良好的抗炎效果,还可明显降低山莨菪碱的阿托品样不良反应。但目前国内外未见有关复方山莨菪碱注射液遗传毒性安全性评价方面的研究报道。为提高临床用药的安全性,本实验采用鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验(Ames 试验)、体外培养 CHO 细胞染色体畸变试验和 ICR 小鼠骨髓微核试验方法评价其是否具有遗传毒性,为进一步的临床研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 受试物及溶媒对照

受试物为复方山莨菪碱注射液,两种成分的化学分子结构式详见图 1 和图 2(无色澄明溶液,批号 20101222;规格:5 ml 中含盐酸消旋山莨菪碱 1 g 与甲硫酸新斯的明 2 mg;由海军军医大学药理学系提供)。溶媒对照为氯化钠注射液(无色透明液体,批号 110714K2,安徽丰原药业股份有限公司)。

1.2 菌株及细胞

组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌(*S.typhimurium*)

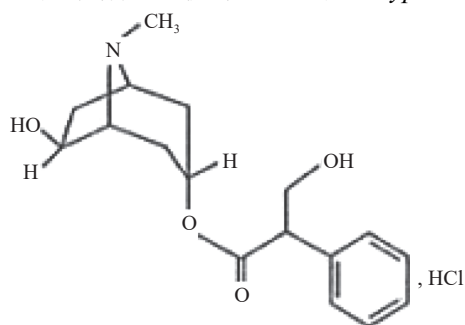


图 1 消旋山莨菪碱结构式^[7]

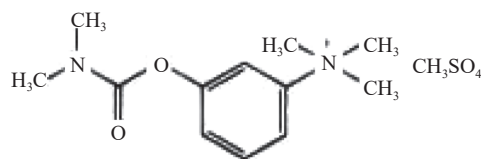


图 2 甲硫酸新斯的明结构式^[7]

TA1535、TA102、TA100、TA98 和 TA97 5 个菌株,由复旦大学公共卫生学院环境卫生教研室赠予,储存于液氮中。实验前进行菌株鉴定,均符合规定标准。CHO 细胞由国家上海新药安全评价研究中心赠予。

1.3 大鼠肝微粒体酶 S9

购自美国 MOLTOX 公司(批号分别为 2765 和 2715,有效期至:2013-05-17 和 2012-02-12),保存于-80℃ 冰箱。

1.4 动物

选用 60 只 SPF 级的 ICR 小鼠,雌雄各半(上海市西普尔-必凯动物有限公司,合格证号 2008001616722)。检疫期为 3 d,每日观察动物的外观、粪便和摄食等情况并记录。自购入日起的当日和检疫结束当日共两次称量所有动物的体重(检疫结束时的体重:雌鼠 21.24~23.74 g;雄鼠 21.32~23.72 g),且根据该体重将雌、雄小鼠分别按随机区组法分组,共分为 6 组,每组 10 只。

1.5 试验方法

按《药物遗传毒性研究技术指导原则》等^[8-9]的设计要求,选用标准试验组合中的细菌回复突变试验^[10],体外染色体畸变试验^[11]和体内微核试验^[12]来全面评价复方山莨菪碱注射液的遗传毒性。

1.5.1 细菌回复突变试验^[13-17]

应用组氨酸缺陷型的鼠伤寒沙门氏菌 TA1535、TA102、TA100、TA98 和 TA97 共 5 种菌株进行测试。对不受溶解度或细胞毒性限制的受试物最高浓度应达到 5 mg/ml^[10],故设复方山莨菪碱注射液(以 5 ml 中含盐酸消旋山莨菪碱 1 g 与甲硫酸新斯的明 2 mg 为计)总剂量为 0.5、5、50、500、5000 μg/ml 共 5 组,此外还有对照组,包括空白对照、溶媒对照和阳性对照。按标准的平板掺入法操作,细菌在有或没有 S9 代谢活化系统(-S9 组在每个平皿的试验体系中加入 0.5 ml 的磷酸缓冲液,+S9 组在每个平皿的试验体系中加入 0.5 ml 的 S9 混合液)的平行条件下,将相应浓度的受试物溶液、溶媒对照品(氯化钠注射液)或阳性对照品溶液分别加入到无菌的试管中(表 1 和表 2)0.1 ml,每个组别均设 3 个平行。以上所有物质与顶层琼脂混匀后,迅速铺浇到

底层琼脂平板上,待其凝固后倒置培养 48~72 h,通过肉眼或显微镜仔细观察各剂量组的菌苔是否正常,区分受试物沉淀与白色菌落,判断是否有由受试物导致的明显抑菌现象,接着采用手工计数的方法记录每皿中全部回复突变的菌落数量,统计 3 个平行皿的均值和标准差,与溶媒对照组进行比较。按上述操作再验证一次。

1.5.2 体外染色体畸变试验^[13-17]

采用体外培养的 CHO 细胞在有或没有 S9 代谢活化系统的平行条件下进行测试。预试验最高浓度设定为 5 mg/ml,再按等比级数设计若干个浓度。正式试验的最高浓度产生的细胞毒性应约为 50%^[11]。故根据预试验测定 IC₅₀(50% 细胞生长抑制浓度)为 235.0 μg/ml,因此一共设 3 个剂量组,依次为 58.75、117.5 和 235.0 μg/ml,另设阳性对照组(-S9 组为 0.5 μg/ml 丝裂霉素 C 溶液,+S9 组为 60 μg/ml 环磷酰胺溶液)和溶媒对照组(氯化钠注

射液),每个组别均设 2 个平行。-S9/4 h 组和+S9/4 h 组:受试物作用细胞 4 h 后弃全部培养基,用 PBS 洗涤后重新添加新的 10 ml 1640 完全培养基,放入培养箱中继续培养至 24 h 后收集细胞;-S9/24 h 组:受试物作用细胞 24 h 后收集细胞。终止培养前 4 h 加入 20 μg/ml 秋水仙碱,目的是使大部分细胞的有丝分裂停止在中期相,所有细胞依次经过 0.75% KCl 低渗、固定(甲醇:冰乙酸=3:1)、涂片和 Gimsa 染色处理,在显微镜下选择染色体数目完整且分散良好的中期分裂相染色体作为观察对象,观察染色体数量和结构的改变。分别记录各组含有结构畸变染色体的细胞数和畸变类型(表 3),计算每组的染色体畸变率。

1.5.3 体内微核试验^[13-17]

采取与临床拟用途径一致的给药方式^[12],对 ICR 小鼠采用单次经尾静脉注射的给药方式。根据受试物急性毒性的试验结果:半数致死量 LD₅₀

表 1 复方山莨菪碱注射液的第 1 次 Ames 试验结果 (个/皿, $\bar{x}\pm s, n=3$)

剂量组(μg/皿)	TA97		TA98		TA100		TA102		TA1535	
	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9
5 000	76.7±4.2	76.3±3.2	46.3±2.3	38.3±6.8	96.3±10.5	112.7±17.0	123.0±2.6	170.7±38.3	15.3±5.0	33.3±9.5
500	69.3±8.3	112.0±12.2	46.0±1.7	45.7±9.7	97.3±11.4	115.3±17.9	187.0±53.8	166.7±41.6	28.3±4.5	30.7±2.1
50.0	74.7±1.2	83.7±14.8	36.7±7.0	39.3±12.8	85.3±3.0	132.7±20.0	183.3±5.7	159.0±36.8	31.3±8.1	30.0±10.5
5.0	76.7±12.3	64.7±11.0	40.7±12.2	36.3±13.6	138.7±47.4	137.7±15.9	158.3±17.4	155.0±32.6	25.3±3.2	27.3±8.3
0.5	63.0±5.2	74.0±20.3	42.7±12.8	36.3±11.9	138.0±45.4	119.3±10.3	176.0±44.2	170.7±40.0	23.3±1.2	29.3±5.7
空白对照	90.7±29.5	78.7±2.3	35.0±4.4	41.3±8.1	119.3±14.0	125.3±9.2	201.3±21.4	192.0±20.8	27.3±6.8	28.0±3.6
溶媒对照	72.0±12.0	72.0±11.1	35.3±2.3	37.0±2.0	121.3±9.0	123.3±9.4	167.3±18.6	210.0±25.0	32.3±6.6	30.0±2.0
阳性对照	653.3±83.3	583.3±28.9	714.0±53.0	625.3±162.0	802.7±140.9	651.0±64.5	1093.3±122.2	1026.7±83.2	622.7±189.9	752.0±44.5

阳性对照品:-S9组TA97、TA98敌克松(50 μg/皿),TA100、TA102 甲基磺酸甲酯(1 μg/皿);TA1535 4-硝基喹啉-N-氧化物(0.5 μg/皿)+S9组TA97、TA98、TA100 2-AF(10 μg/皿);TA102 1,8-二羟基蒽醌(50 μg/皿);TA1535环磷酰胺(50 μg/皿)

表 2 复方山莨菪碱注射液的第 2 次 Ames 试验结果 (个/皿, $\bar{x}\pm s, n=3$)

剂量组(μg/皿)	TA97		TA98		TA100		TA102		TA1535	
	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9
5 000	65.0±23.4	64.7±15.7	17.0±3.5	25.7±1.5	74.3±1.0	89.0±4.4	108.3±6.6	102.7±19.2	18.3±2.1	16.0±3.5
500	73.0±6.1	69.0±12.1	22.0±6.9	20.3±2.9	82.3±24.4	97.7±7.8	162.0±45.4	169.3±31.0	20.0±4.6	19.0±5.6
50.0	74.0±26.4	78.3±7.1	20.0±6.2	24.3±7.5	82.3±29.4	88.0±8.2	188.3±4.5	157.0±37.6	22.0±5.3	20.0±3.6
5.0	60.7±16.8	58.0±8.0	24.0±3.0	21.3±3.9	92.0±45.2	89.7±10.0	162.7±51.0	161.0±35.0	22.7±9.8	21.0±3.6
0.5	56.7±8.1	68.7±11.8	21.0±6.0	19.0±1.7	104.0±31.2	97.7±7.6	143.0±56.2	157.3±41.0	20.0±2.6	24.0±2.0
空白对照	80.7±7.0	76.7±2.1	25.3±2.5	22.3±6.8	110.0±10.0	102.7±30.6	221.3±34.0	151.0±36.8	17.3±3.0	15.0±5.2
溶媒对照	85.7±7.6	84.0±7.0	24.0±5.2	21.3±3.0	111.3±21.9	92.3±7.4	169.3±18.0	155.0±32.4	30.3±9.3	23.3±5.0
阳性对照	660.0±66.8	581.0±157.0	564.0±65.8	618.7±112.1	565.3±65.2	657.3±115.7	1064.0±24.0	1044±26.2	552.0±78.0	597.0±89.3

阳性对照品:-S9组TA97、TA98敌克松(50 μg/皿),TA100、TA102 甲基磺酸甲酯(1 μg/皿);TA1535 4-硝基喹啉-N-氧化物(0.5 μg/皿)+S9组TA97、TA98、TA100 2-AF(10 μg/皿);TA102 1,8-二羟基蒽醌(50 μg/皿);TA1535环磷酰胺(50 μg/皿)

为 60.4 mg/kg。本次试验的最高剂量为 1/2 的 LD₅₀, 最高剂量之下的其他剂量保持剂量间距为 2~3 倍^[12]。故共设 3 个剂量组(分别为 7.5、15.0 和 30.0 mg/kg), 及溶媒对照组(氯化钠注射液, 给药方式与受试物组相同)和阳性对照组(剂量为 40 mg/kg 的环磷酰胺溶液, 临用时用氯化钠注射液配制成 4.0 mg/ml 的环磷酰胺溶液, 给药方式为单次腹腔注射), 给药容积均为 10 ml/kg。因此, 总共有六组, 其中的高剂量组有两组, 分别在药物作用 24 h 和 48 h 后处死, 除高剂量 48 h 组外, 其他组均在药物作用 24 h 后处死。取小鼠两侧大腿股骨制备骨髓涂片, 每只小鼠制 2 张骨髓片, 自然干燥后染色。所有动物均镜检约 1 000 个嗜多染红细胞(PCE), 计数含微核的 PCE 数(MNPCE), 统计微核发生率, 在记录 200 个 PCE 的同时计数观察到的所有正染红细胞(NCE)的数量(表 4), 通过 PCE/

NCE 值来评价受试物是否具有骨髓毒性。

1.6 判定标准

细菌回复突变试验的结果判定是将各剂量组的受试物与溶媒对照组的回复突变菌落数进行比较, 如果某个组别的回复突变菌落数是溶媒对照组突变菌落数的 2 倍及以上, 且可重复性, 并在剂量范围内存在着剂量-反应关系, 则判断为阳性; 体外染色体畸变试验和体内微核试验的结果, 也是与溶媒对照组进行比较, 均采用卡方检验, 检验标准以 $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 细菌回复突变试验

所有平皿经均未见杂菌污染, 可观察到目标菌苔的正常生长。所有菌株的自发回复突变菌落数和阳性物诱发的回复突变菌落数都在历史对照数

表 3 复方山莨菪碱注射液对体外培养 CHO 细胞的染色体畸变试验结果

剂量组(μg/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		
溶媒对照组	200	0	0	2	0	0	0	0	2	1.0
58.75	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0
-S9/24 h	117.5	200	0	0	0	0	0	0	0	0
235.0	200	2	0	0	0	0	0	0	2	1.0
阳性对照组	100	25	2	0	3	0	4	0	21	21.0*
58.75	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0.5
-S9/4 h	117.5	200	1	0	0	0	0	0	1	0.5
235.0	200	2	0	0	0	0	0	0	2	1.0
溶媒对照组	200	0	0	0	0	0	1	0	1	0.5
58.75	200	2	0	0	0	0	0	0	2	1.0
+S9/4 h	117.5	200	1	0	0	0	0	0	1	0.5
235.0	200	1	0	1	0	0	0	0	2	1.0
阳性对照组	100	15	1	0	1	1	8	0	20	20.0*

* $P<0.05$, 与溶媒对照组比较。

表 4 复方山莨菪碱注射液对 ICR 小鼠骨髓微核试验结果

剂量组(mg/kg)	动物数(只)	雄鼠			雌鼠		
		观察PCE数(个)	PCE/(PCE+NCE)	微核率($\bar{x}\pm s$, ‰)	观察PCE数(个)	PCE/(PCE+NCE)	微核率($\bar{x}\pm s$, ‰)
溶媒对照组	5	10 125	1.00±0.15	0.40±0.22	10 364	1.03±0.16	0.30±0.27
7.5	5	10 079	1.33±0.16	0.60±0.22	10 085	0.98±0.19	0.40±0.41
15.0	5	10 019	1.33±0.38	2.00±0.35	10 086	1.56±0.11	2.38±1.07
30.0(24 h采样)	5	9 879	1.37±0.30	2.12±1.07	10 131	1.34±0.12	2.07±1.08
30.0(48 h采样)	5	9 340	1.44±0.30	1.38±1.31	9 642	1.45±0.22	1.45±0.94
阳性对照组	5	10 192	0.78±0.10	17.62±10.40*	10 673	0.85±0.09	26.31±4.34*

* $P<0.05$, 与溶媒对照组比较。

数据库的范围内,且阳性对照组与空白对照组相比回复突变菌落数是显著增加的,该结果提示整个试验系统符合要求^[13-17]。最高浓度已达到5 mg/皿时,未观察到复方山莨菪碱注射液的抑菌现象。两种平行条件下,即有或没有S9代谢活化系统中,各剂量组的受试物所诱发的回复突变菌落数均与自发的回复突变菌落数接近,未见明显的剂量-反应关系。两次结果见表1和表2。

2.2 体外染色体畸变试验

经显微镜观察,阳性对照组能显著诱发细胞染色体的畸变,与溶媒对照组相比差异均有统计学意义($P<0.05$),验证了该系统的有效性^[13-17];复方山莨菪碱注射液各剂量组的CHO细胞染色体畸变率与溶媒对照组相比差异均无统计学意义($P>0.05$),结果见表3。

2.3 体内微核试验

各剂量组小鼠在给药后未见异常,且未出现动物死亡。雌、雄小鼠在给予阳性对照品后,其骨髓嗜多染红细胞的微核发生率与溶媒对照组相比均有统计学意义($P<0.05$),提示试验系统符合要求^[13-17]。复方山莨菪碱注射液各剂量组的雌、雄小鼠骨髓PCE/(PCE+NCE) > 50%,即受试物对骨髓无抑制作用,各剂量组微核率与溶媒对照组相比均无统计学意义($P>0.05$)。结果见表4。

3 讨论

作为单药,山莨菪碱与甲硫酸新斯的明均已进行过完整的遗传毒性评价,且皆为阴性。但既往研究表明,药物联合作用可改变单药的致突变性。用TA98、TA100和TA102菌株对顺铂和卡铂与新斯的明、博莱霉素、5-氟尿嘧啶和长春新碱联合用药的遗传毒性进行评价,发现药物之间的相互作用会产生抗致突变性作用,联合用药时的致突变性比单药要低^[18]。复方山莨菪碱是由盐酸消旋山莨菪碱与甲硫酸新斯的明按照500:1的比例组成的复方注射剂,为考察其是否会产生与单药不同的遗传毒性,本研究按照《药物遗传毒性研究技术指导原则》^[8]推荐的组合方法,分别从体外到体内,从微生物、离体细胞和整体动物水平上对复方山莨菪碱注射液的遗传毒性进行了评价,该试验组合能检测染色体畸变、基因突变等多个遗传学终点^[8-9]。Ames试验表明复方山莨菪碱注射液在0.5、5、50、500、5 000 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 受试剂量下,两种平行条件下,即有或没有S9代谢活化系统时,与溶媒对照组的突变菌落数进行比较,各剂量组所诱发的回复突变菌落数

均和其相近。CA试验结果表明58.75、117.5和235.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 3个剂量的受试物,所有剂量在两种平行的系统条件下(即有或没有S9代谢活化系统时)对CHO细胞的染色体无明显的畸变影响。MNT试验设的7.5、15.0和30.0 mg/kg 3个剂量,对ICR小鼠骨髓的微核诱发率均无统计学意义($P>0.05$)。以上结果显示,在本实验条件下,复方山莨菪碱注射液对鼠伤寒沙门氏菌无致突变性,对哺乳动物培养细胞染色体无致畸变作用,对ICR小鼠骨髓嗜多染红细胞无诱发微核的效应;此也提示复方山莨菪碱注射液在受试条件下对人体不具有潜在致癌性和遗传毒性。

综上所述,在本实验条件下结果提示复方山莨菪碱注射液不具有遗传毒性和潜在致癌性,与单方相关的文献报道结论基本相符,本研究结果为该药的临床安全性评价提供了前期科学依据。

【参考文献】

- [1] LEE D M, WEINBLATT M E. Rheumatoid arthritis[J]. *Lancet*, 2001, 358(9285): 903-911.
- [2] METZ C N, TRACEY K J. It takes nerve to dampen inflammation[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(8): 756-757.
- [3] 孙利. 莨菪碱类药物抗休克的 β -arrestins抗炎机制[D]. 上海: 第二军医大学, 2010.
- [4] 崔美健. 山莨菪碱和新斯的明联合治疗小鼠类风湿性关节炎的作用研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2013.
- [5] 闫金雨. 山莨菪碱结合腔内成形术对膝下动脉阻塞病治疗作用的研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2010.
- [6] 刘凤琴. 山莨菪碱注射液外用改善末梢循环的临床疗效观察[J]. *山西医药杂志*, 2018, 47(22): 2705-2707.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 二部. 化学工业出版社, 2020.
- [8] 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[Z]HGPT2-1.2007.
- [9] ICH指导委员会. 药品注册的国际技术要求-安全性部分: 中英对照[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 37-61.
- [10] OECD. Test Guidance 471: Bacterial Reverse Mutation Test[S]//OECD Guidance For Testing of Chemicals. Paris: Organization for Economic Cooperation & Development, 1997: 1-8.
- [11] OECD. Test Guidance 473: In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test[S]// OECD Guidance for Testing of Chemicals. Paris: Organization for Economic Cooperation & Development, 1997: 1-7.
- [12] OECD. Test Guidance 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test[S]//OECD Guidance for Testing of Chemicals. Paris: Organization for Economic Cooperation & Development, 1997: 1-7.
- [13] 田逸君, 朱玉平, 马玺里, 等. 益母草碱对胚胎-胎仔发育毒性和遗传毒性的评价[J]. *药学实践杂志*, 2020, 38(5): 451-457.

[14] 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.
[15] 侍雯婧, 田逸君, 黄才国, 等. Wentilactone A的遗传毒性评价[J]. 药学实践杂志, 2020, 38(6): 533-538.
[16] 侍雯婧, 张吉芊竹, 朱江波, 等. 盐酸苯海拉明咖啡因复方的遗传毒性评价[J]. 癌变·畸变·突变, 2022, 34(2): 149-157.
[17] 朱玉平, 张天宝, 万旭英, 等. 红景天苷注射液遗传毒性的研

究[J]. 药学服务与研究. 2009, 9(4): 279-281.

[18] HANNAN M A, AL-DAKAN A A, HUSSAIN S S, et al. Mutagenicity of cisplatin and carboplatin used alone and in combination with four other anticancer drugs[J]. *Toxicology*, 1989, 55(1-2): 183-191.

[收稿日期] 2022-06-09 [修回日期] 2022-09-21

[本文编辑] 李睿旻

(上接第30页)

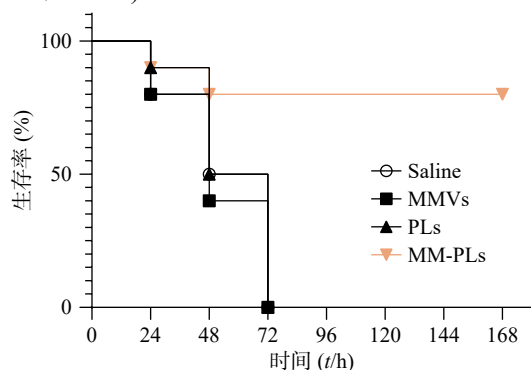


图5 小鼠时间-生存曲线 (n=10)

Saline: 生理盐水; MMVs: 巨噬细胞膜囊泡; PLs: 脂质体;
MM-PLs: 巨噬细胞膜杂合脂质体。

【参考文献】

[1] GENOVESE C, LA FAUCI V, D'AMATO S, et al. Molecular epidemiology of antimicrobial resistant microorganisms in the 21th century: a review of the literature[J]. *Acta Biomed*, 2020, 91(2): 256-273.
[2] LEE CR, CHO IH, JEONG BC, et al. Strategies to minimize antibiotic resistance[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2013, 10(9): 4274-305.
[3] HORSEMAN M A, SURANI S. A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: an important cause of severe *Sepsis* and skin and soft-tissue infection[J]. *Int J Infect Dis*, 2011, 15(3): e157-e166.
[4] 洪广亮, 卢才教, 赵光举, 等. 创伤弧菌脓毒症诊疗方案(2018)[J]. 中华急诊医学杂志, 2018, 27(6): 594-598.
[5] KIM H R, RHO H W, JEONG M H, et al. Hemolytic mechanism of cytolysin produced from *V. vulnificus*[J]. *Life Sci*, 1993, 53(7): 571-577.
[6] LOS F C, RANDIS T M, AROIAN R V, et al. Role of pore-forming toxins in bacterial infectious diseases[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2013, 77(2): 173-207.
[7] YUAN Y, FENG Z, WANG J. *Vibrio vulnificus* hemolysin: bio-

logical activity, regulation of *vwhA* expression, and role in pathogenesis[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 599439.

[8] QIN K W, FU K F, LIU J F, et al. *Vibrio vulnificus* cytolysin induces inflammatory responses in RAW_{264.7} macrophages through calcium signaling and causes inflammation *in vivo*[J]. *Microb Pathog*, 2019, 137: 103789.
[9] HU C M J, FANG R H, COPP J, et al. A biomimetic nanosponge that absorbs pore-forming toxins[J]. *Nat Nanotechnol*, 2013, 8(5): 336-340.
[10] CAO H Q, DAN Z L, HE X Y, et al. Liposomes coated with isolated macrophage membrane can target lung metastasis of breast cancer[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(8): 7738-7748.
[11] HE Y W, LI R X, LI H C, et al. Erythroliosomes: integrated hybrid nanovesicles composed of erythrocyte membranes and artificial lipid membranes for pore-forming toxin clearance[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(4): 4148-4159.
[12] DAL PERARO M, VAN DER GOOT F G. Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14(2): 77-92.
[13] QIN S G, XIAO W, ZHOU C M, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 199.
[14] ALLEN R C, POPAT R, DIGGLE S P, et al. Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs? *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12(4): 300-308.
[15] BISCHOFBERGER M, IACOVACHE I, VAN DER GOOT F G. Pathogenic pore-forming proteins: function and host response[J]. *Cell Host Microbe*, 2012, 12(3): 266-275.
[16] MOLINARO R, CORBO C, MARTINEZ J O, et al. Biomimetic proteolipid vesicles for targeting inflamed tissues[J]. *Nat Mater*, 2016, 15(9): 1037-1046.
[17] KIM Y R, KIM B U, KIM S Y, et al. Outer membrane vesicles of *Vibrio vulnificus* deliver cytolysin-hemolysin VvhA into epithelial cells to induce cytotoxicity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 399(4): 607-612.

[收稿日期] 2022-07-01 [修回日期] 2022-10-09

[本文编辑] 李春德