

# 计划生育药HG提取物的特殊毒理学研究

林飞<sup>1</sup> 高沛永<sup>2</sup> 宋谊平<sup>1</sup> 万先伦<sup>3</sup>

<sup>1</sup>中国药品生物制品检定所 北京 100050 <sup>2</sup>军事医学科学院放射医学所 <sup>3</sup>贵阳医学院药理学系

**摘要** 本文用Ames试验、小鼠微核试验和中国仓鼠肺细胞体外染色体畸变试验研究了HG提取物的致突变作用。用受孕小鼠研究了HG提取物的致畸胎作用。结果表明,Ames试验在10mg/皿浓度下未见回复突变作用;微核试验在105g/kg剂量下未诱发微核率增高;染色体畸变试验在300 $\mu$ g/ml浓度下不出现细胞染色体畸变率升高;小鼠致畸胎试验在9g/kg剂量下不存在胚胎毒性和致畸毒性。

**关键词** 致突变;致畸胎;遗传毒性;胚胎毒性

HG是一种植物的外皮,在我国西南各省均有野生,当地居民有用其进行堕胎的记载。动物药效学试验表明,HG粗提物具有抗着床、抗早孕作用<sup>(1)</sup>。本文按国家卫生部颁布的《新药审评办法》及有关规定<sup>(2)</sup>,对经醇提取后的HG粉进行了致突变和致畸胎试验。

## 材料和方法

HG提取物为红褐色粉末,1g相当于原生药13g,由贵阳医学院药理学系提供。蒸馏水溶解后用于试验。阳性对照剂中阿的平(Mep)、正定霉素(DMC)、环磷酰胺(CP)和丝裂霉素C(MC)为药品,购于医院药房;2—乙酰胺基芴(AAF)、4—硝基喹啉(4-NQO)和吖啶橙(AO)为化学品,购于化学试剂商店。实验用动物由中国药品生物制品检定所实验动物中心提供。实验用菌株和细胞株均为国外引进,本所传代培养或冷冻保存。

### 1. Ames试验

菌株为组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌TA97、TA98、TA100和TA102。菌株经生物学特性鉴定合格后,用预培养法进行检测。HG提取物经蒸馏水稀释成10mg/ml,用菌株TA100进行预试验,在100—0.16mg/ml浓度范围内均未见毒性反应。正式

试验最高浓度为10mg/皿,下设4个浓度组,外加阴性对照和阳性对照组。每次试验加代谢活化剂(+S9)和不加代谢活化剂(-S9)同时进行,重复试验2次。

### 2. 微核试验

采用NIH种雄性小鼠,体重20—22g。预试验在最大溶解浓度和最大给药体积下灌胃给药,给药后12、24、36、48和72h分别取6只小鼠采样、制片。结果各时间点骨髓细胞微核率未见明显变化。正式试验分3个剂量组,外加溶剂对照和阳性对照组,每组6只小鼠,1次灌胃给药后24h取股骨骨髓制片,吖啶橙染色后在荧光显微镜下对每只小鼠计数1000个嗜多染红细胞中所含微核细胞数。

### 3. 哺乳类细胞染色体畸变试验

采用中国仓鼠肺细胞体外传代培养的染色体畸变试验法。预试验经结晶紫染色法确定50%细胞生长抑制浓度为300 $\mu$ g/ml。正式试验共设3个浓度组,外加溶剂对照、S9对照和阳性对照组。加代谢活化剂(+S9)和不加代谢活化剂(-S9)同时进行,分别在24h和48h收获细胞。常规方法制备染色体标本,显微镜下每组观察100个中期分裂细胞,计数染色体畸变率。

### 4. 致畸胎试验

采用体重  $25 \pm 2g$  昆明种小鼠, 以雄 雌 = 1 2 合笼, 连续交配 5d, 每天早晚检查雌鼠阴栓, 以阴栓存在作为妊娠 d0。受孕鼠随机分成 5 组, 每组 20 只, 于妊娠 d6—15 连续灌胃给药, 以最大溶解浓度和最大给药体积作为高剂量组; 阳性对照组在妊娠 d8—12 连续腹腔注射给药。受孕鼠在 d0、6、10、13、16 和 18 称体重, 脱颈椎处死, 剖腹取胎, 测量胚胎身长、尾长和体重, 并计数活胎数、死胎数、总着床数和黄体数。将全部胚胎的 1/2 用

Bouins 液固定后, 切片检查内脏器官发育情况, 另 1/2 胚胎经茜素红染色后检查骨骼发育情况。

## 结 果

### 1. Ames 试验

HG 提取物各浓度组的平均回变菌落数与阴性对照组相仿, 阳性对照组的回变菌落数增加明显, 均在阴性对照组平均回变菌落数的 4 倍以上 (见表 1)。

表 1. HG 提取物 Ames 试验

浓度 ( $\mu g/$ 皿)	菌株回变菌落数( $x \pm s$ )							
	TA 97		TA 98		TA 100		TA 102	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
10000	176 $\pm$ 7	161 $\pm$ 18	42 $\pm$ 7	51 $\pm$ 9	153 $\pm$ 9	141 $\pm$ 18	288 $\pm$ 17	302 $\pm$ 18
1000	153 $\pm$ 20	164 $\pm$ 8	51 $\pm$ 2	44 $\pm$ 11	135 $\pm$ 6	150 $\pm$ 34	306 $\pm$ 37	309 $\pm$ 13
100	159 $\pm$ 12	155 $\pm$ 13	52 $\pm$ 9	45 $\pm$ 4	129 $\pm$ 2	150 $\pm$ 25	325 $\pm$ 16	298 $\pm$ 15
10	146 $\pm$ 4	144 $\pm$ 15	47 $\pm$ 5	43 $\pm$ 3	123 $\pm$ 6	136 $\pm$ 17	311 $\pm$ 23	304 $\pm$ 21
1	138 $\pm$ 7	133 $\pm$ 12	48 $\pm$ 6	49 $\pm$ 4	135 $\pm$ 22	137 $\pm$ 15	338 $\pm$ 11	311 $\pm$ 23
0	166 $\pm$ 27	151 $\pm$ 19	48 $\pm$ 1	47 $\pm$ 1	138 $\pm$ 13	151 $\pm$ 20	312 $\pm$ 26	319 $\pm$ 12
阳性 对照	M ep 1000mg	AAF 40mg	DMC 5mg	AO 40mg	4- NQO 1mg	CP 250mg	MC 1mg	MC 1mg
	665	684	664	1568	888	688	2520	2340

### 2 微核试验

溶剂对照组微核细胞率 2.5%; 阳性对照组微核细胞率增加明显达到 32.8%, 统计学分析具有非常显著性差异 ( $P < 0.01$ ); HG

提取物各剂量组微核细胞率均在 1.5-3.8% 之间, 与溶剂对照组比较统计学无显著性差异 ( $P > 0.05$ ) (见表 2)。

表 2. HG 提取物微核试验

组 别	剂量 (g/kg)	动物数 (只)	多染红细胞 (个)	微核数 (个)	微核率 ‰	P 值
蒸馏水	0	6	6000	15	2.5	—
CP	100.0	6	6000	197	32.8	< 0.01
HG	10.5	6	6000	9	1.5	> 0.05
	6.3	6	6000	15	2.5	> 0.05
	2.1	6	6000	12	2.0	> 0.05

### 3 哺乳类细胞染色体畸变试验

溶剂对照组畸变细胞率均在 4% 以下; 阳性对照组畸变细胞率均超过 50%, 与溶剂对照组比较统计学具有非常显著性差异 ( $P$

< 0.01)。HG 提取物各浓度组与溶剂对照组的畸变细胞率相仿, 统计学分析无显著性差异 ( $P > 0.05$ ) (见表 3)。

表3 HG 提取物染色体畸变试验

组别	浓度 μg/ml	畸变细胞%		48h- S9	畸变类型#
		24h- S9	24h+ S9		
蒸馏水	0	—	4.0	2.5	b e r p f
MC	0.05	30.0	-	75.0	b e r t p z d f
CP	50	-	50.0	-	b e r t d f
HG	300	2.0	3.0	1.0	b f
	150	1.0	2.0	1.0	b d f
	75	2.0	3.0	2.0	b e f

# b 染色单体断裂; e 染色单体互换; r 环; t 易位; p 多倍体; z 粉碎化; d 双着丝粒; f 短片

4 致畸胎试验

试验结果表明, 溶剂对照组和HG 各剂量组的孕鼠在妊娠期间体重增长稳定, 各时间点数值均在正常范围。

对孕鼠生殖毒性和胚胎生长发育结果表明, 溶剂对照组和HG 各剂量组在平均黄体数(10.2- 11.2)、平均着床数(8.4- 10.7)、

平均活胎数(7.8—10.0)、平均死胎数(0.36—10.7)及胚胎体重(1.33—1.45g)、胚胎身长(2.35—2.42cm)、胚胎尾长(1.11—1.13cm)等各项指标均在正常数值范围。

表4 结果表明, 溶剂对照组和HG 各剂量组的胚胎骨化不全和骨骼畸形发生率很低(各组均小于4例)。

表4 HG 提取物对胚胎骨骼发育的影响

组别	剂量 mg/kg	胚胎 总数	骨化不全率			骨骼畸形率			总畸形 %
			后头骨小	胸骨小	后头骨	断肋	波状肋	肋间大	
蒸馏水	0	95	1.05	1.05	1.05	1.05	0	0	4.21
CP	0.005	103	27.18 <sup>#</sup>	0.97	0	13.59 <sup>#</sup>	46.60 <sup>#</sup>	7.77 <sup>#</sup>	68.93 <sup>#</sup>
HG	9.000	110	1.82	0	0.91	0	0	0	1.82
	3.000	84	0	1.19	0	0	0	0	1.19
	1.000	94	1.06	1.06	0	1.06	0	0	3.20

# P < 0.01

表5 结果表明, 溶剂对照组和HG 各剂量组的胚胎内脏器官发育不全和畸形发生率很低(各组均小于4例); 而阳性对照组有3

例存在发育不全, 有35例存在器官畸形, 胚胎总畸形率高达41%, 与溶剂对照组比较统计学具有非常显著性差异(P < 0.01)。

表5 HG 提取物对胚胎器官发育的影响

组别	剂量 mg/kg	胚胎 总数	发育不全率			器官畸形率				总畸形 %
			心小	肾小	腭裂	开眼	肾移位	脑膨出	肠露	
蒸馏水	0	100	1.00	0	0	0	0	1.00	0	2.00
CP	0.005	89	0	3.37 <sup>#</sup>	12.36 <sup>#</sup>	3.37 <sup>#</sup>	4.49 <sup>#</sup>	8.99 <sup>#</sup>	11.24 <sup>#</sup>	40.45 <sup>#</sup>
HG	9.000	104	0	0.96	0.96	0	0.96	0	0.96	2.88
	3.000	88	0	1.14	0	0	1.14	0	2.28	3.42
	1.000	98	0	2.04	0	0	1.02	0	0	3.06

# P < 0.01

## 讨论

HG 是新发现的药用植物,在国家药典和各地方药品标准中均无收载,按国家新药审批办法有关新药中药分类<sup>(3)</sup>,属于中药一类新药。药效学结果已证实具有抗着床和抗早孕作用,本文研究结果表明,HG 提取物不具有体外基因突变和染色体畸变,也不引起体内骨髓细胞染色体的损伤,存在遗传毒性的可能较小;还表明了HG 提取物对已妊娠的动物在器官发生期连续给药后,未发现对孕鼠生殖、胚胎生长发育等方面的影响,存在胚胎毒性和致畸毒性的可能性较小。

妊娠终止药进行致畸胎试验时有一定的难度,主要原因是较大剂量给药因流产而得不到试验结果,降至不流产的剂量因高剂量给药量太低所得到的试验结果将影响准确性和可靠性。我们在进行HG 提取物致畸试验时,曾设计了多种试验方案,包括各种剂量下的给药、不同妊娠时期给药以及体外致畸试验等。但试验中用常规小鼠致畸胎试验在很高给药剂量下,未见受孕鼠出现明显的流产,

分析可能与该药药效学活性主要作用于着床期前后有关;也可能与植物的采摘期或提取工艺尚未固定,有关成分减少或丢失有关。

HG 是中药一类新药,又是计划生育药品,除本文致突、致畸的四个试验外,应增加动物的妊娠前、着床期和哺乳期等一般生殖毒性试验<sup>(4)</sup>,即在交配前 14d 对雌鼠开始给药,连续给药至妊娠后 10d;和围产期毒性试验,即妊娠 d15 开始给药,连续给药至分娩后 21d;以证明交配期、着床期和哺乳期所存在的毒性及其大小。

## 参考文献

1. 万先伦 HG 抗着床和终止妊娠作用的实验研究 贵阳医学院学报, 1989; 14(4): 247.
2. 中华人民共和国卫生部 附件五: 新药药理、毒理研究的技术要求 新药审批办法(一九八五年七月一日起施行), 1985: 45—50
3. 中华人民共和国卫生部 关于审批管理部分的修订和补充规定 新药审批办法(有关中药部分的修订和补充规定), 1992: 2—3
4. 卫生部药政局 生殖毒性试验 中药新药研究指南(药理学、毒理学), 1994: 221—222

## 褪黑素胶囊的毒性研究及安全性评价

傅剑云 夏勇 徐彩菊 吴蕙岭 许天新 赵硕 卢少华

浙江省卫生防疫站 杭州 310009

**摘要** 本研究表明:褪黑素胶囊大、小鼠急性经口毒性半数致死量(LD<sub>50</sub>),雌雄两性均大于10g/kgB.W.,属实际无毒类,Ames 试验、小鼠骨髓细胞微核试验和小鼠精子畸形试验结果均为阴性。在本试验条件下,褪黑素胶囊为实际无毒,未显示有致突变作用。

**关键词** 褪黑素胶囊; 毒性; 安全性评价

褪黑素(Melatonin)具有抗衰老、提高机体免疫力等作用,在欧美等国已作为保健食品应用。本产品褪黑素由人工合成,为科学地评价其作为保健食品的安全性,保证消费者

的食用安全,我们对其毒性和安全性进行了研究。

材料和方法