

网络出版时间:2014-09-10 18:19

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.10.045

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.10.045.html>

连翘苷对小鼠遗传物质的损伤作用

赵咏梅, 张思琪

(西安文理学院 生物技术学院, 陕西 西安 710065)

[摘要] **【目的】**评价连翘苷对小鼠遗传物质的损伤作用,为揭示连翘苷对动物细胞影响的机理及其临床应用提供参考。**【方法】**给小鼠腹腔注射 1 500, 1 250, 1 000, 750, 500 和 250 mg/kg 的连翘苷 1 次,连续观察 10 d,记录小鼠死亡数,采用改良寇氏法计算连翘苷对小鼠的半数致死量(LD₅₀)。然后给小鼠腹腔注射 250, 500, 750 和 1 000 mg/kg 的连翘苷连续 5 d,取小鼠骨髓嗜多染红细胞、肝组织和小鼠精子样品,检测连翘苷对嗜多染红细胞微核率、肝细胞彗星试验细胞拖尾率和小鼠精子畸变率的影响。以腹腔注射羧甲基纤维素钠溶液和环磷酰胺的小鼠分别为阴性和阳性对照。**【结果】**连翘苷对小鼠的 LD₅₀ 为 1 086 mg/kg。连翘苷剂量≥500 mg/kg 时,嗜多染红细胞微核率和总核异常率极显著提高($P<0.01$),1 000 mg/kg 时微核率和总核异常率分别达到最高值 2.28% 和 18.94%;在受试剂量下,彗星电泳肝细胞 DNA 拖尾率与阴性对照组相比,差异无统计学意义;与阴性对照组相比,连翘苷剂量≥500 mg/kg 时小鼠精子畸形率显著或极显著提高。**【结论】**高剂量(≥500 mg/kg)连翘苷能使小鼠嗜多染红细胞微核率和雄性小鼠精子畸形率上升,有一定的遗传毒性;连翘苷对小鼠肝细胞 DNA 无损伤作用。

[关键词] 连翘苷;遗传毒性;小鼠

[中图分类号] R285

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2014)10-0035-05

Damage of phillyrin to genetic material of mice

ZHAO Yong-mei, ZHANG Si-qi

(School of Biological Technology, Xi'an University of Arts and Science, Xi'an, Shaanxi 710065, China)

Abstract: **【Objective】** This study evaluated the damage of phillyrin to genetic material of mice, aiming to reveal the mechanism how phillyrin could effect animal cell and to provide theoretical basis for its clinical application. **【Method】** The median lethal dose (LD₅₀) of phillyrin to mice was calculated using modified Karber's method by intraperitoneal injecting 1 500, 1 250, 1 000, 750, 500 and 250 mg/kg phillyrin to mouse and counting the deaths for 10 d. The mice bone marrow polychromatic erythrocyte (PCE), hepatic tissue and sperm samples were collected to detect the effect of phillyrin on micronucleus (MN) frequency, hepatic cell comet tail rate and mouse sperm aberration rate by intraperitoneal injecting 250, 500, 750 and 1 000 mg/kg phillyrin to mice for 5 days. Injection of sodium carboxymethyl solution was used as negative control and injection of cyclophosphamide was used as positive control. **【Result】** The LD₅₀ of phillyrin to mice was 1 086 mg/kg. MN frequency of PCE and the total nucleus abnormity rate in bone marrow increased very significantly ($P<0.01$) when phillyrin dose was ≥500 mg/kg. The highest frequency of MN and the total nucleus abnormity rate were 2.28% and 18.94% when phillyrin dose was 1 000 mg/kg. No statistical difference was found in comet tail DNA rate between phillyrin dose group and negative control group. Compared with negative control group, sperm aberration rate increased significantly ($P<0.05$) or very significantly ($P<0.01$) when phillyrin dose was ≥500 mg/kg. **【Conclusion】** Phillyrin had limited

[收稿日期] 2014-03-17

[基金项目] 陕西省科技厅农业攻关计划项目(2013k01-03);西安市科技局科技创新项目(CX12189WL07)

[作者简介] 赵咏梅(1968—),女,陕西西安人,教授,硕士,主要从事细胞与生物天然产物研究。E-mail: xazym1118@163.com

genotoxicity because high dose phillyrin (≥ 500 mg/kg) increased MN frequency of PCE and sperm aberration rate. However, phillyrin had no damage effect on DNA of hepatic cells in mice.

Key words: phillyrin; genotoxicity; mice

连翘(*Forsythia suspense* (Thunb.))为木犀科连翘属植物,是中国临床常用传统中药之一。中医认为,连翘根、茎、叶及果实皆可入药,其味苦、性微寒,归肺、心、胆经,具有清热解毒、散结消肿、疏散风热的功效。连翘苷是从连翘的干燥果实及叶中提取的主要活性物质之一,在前期的研究中,笔者证实了连翘苷不仅具有清除自由基、减肥降血脂作用,还能够抑制线粒体的氧化损伤^[1-2]。同时,有学者研究发现,低剂量连翘苷可以抑制 1-甲基-4-苯基吡啶离子(1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP⁺)诱导的神经细胞损伤,增加细胞活性^[3]。目前,连翘已广泛用于炎症、病毒、发烧、溃疡的治疗^[4-8],其存在的遗传毒性也逐渐被人们所认识。王虹等^[9]认为,高浓度的连翘水提物能明显提高哺乳动物精子畸形率,连翘中另一重要活性物质连翘酯苷对细胞的遗传毒性和对小鼠的急性毒性作用也已得到证实^[10-11]。然而关于连翘苷遗传毒性的研究还未见报道。为了给临床用药提供依据,在前期研究的基础上,本试验对连翘苷的遗传毒性进行了研究,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 ICR 小鼠,由西安交通大学医学院实验动物中心提供,雌雄各半,体质量(20 ± 2) g/只。基础饲料由西安交通大学医学院实验动物中心提供。试验前,小鼠在温度为(23 ± 3) °C、相对湿度为 50%~70%的动物饲养室内适应喂养 1 周,12 h 照明循环。

1.1.2 连翘苷 从采自秦岭北麓蓝田灞源段的连翘叶中提取的连翘苷,经检测纯度达 96%。试验前,用质量分数 0.5%的羧甲基纤维素钠溶液溶解连翘苷,100 Hz 超声助溶。

1.1.3 主要仪器 DYY-6C 细胞电泳仪、奥林巴斯 BX-51 荧光显微镜和 SigmaTDL-5 台式高速离心机等。

1.2 方法

1.2.1 连翘苷对小鼠的急性毒性 将小鼠根据体质量随机分组,每组 6 只,雌雄各半,依据半数致死量(LD₅₀)计算的设计原则,分别腹腔注射不同剂量的连翘苷溶液 0.5 mL/只(剂量分别为 1 500,

1 250, 1 000, 750, 500 和 250 mg/kg)1 次,进行急性毒性试验,连续观察 10 d,记录小鼠的死亡数,以改良寇氏法^[11]求 LD₅₀:

$$LD_{50} = \lg^{-1} [X_m - i(\sum p - 0.5)]。$$

式中: X_m 为最大剂量组剂量的常用对数值; i 为剂间比的常用对数值; p 为各组死亡率。

1.2.2 连翘苷对小鼠骨髓嗜多染红细胞的影响

将健康小鼠随机分阳性对照组、阴性对照(溶剂)组及 4 个连翘苷染毒组,每组 5~6 只小鼠。阳性对照组小鼠腹腔注射环磷酰胺溶液 0.5 mL/只,剂量为 45 mg/kg,连续注射 2 d,每天 1 次;阴性对照组小鼠腹腔注射质量分数 0.5%的羧甲基纤维素钠溶液 0.5 mL/只,连续注射 5 d,每天 1 次;连翘苷染毒组小鼠分别腹腔注射不同剂量的连翘苷 0.5 mL/只(剂量分别为 250, 500, 750 和 1 000 mg/kg),连续注射 5 d,每天 1 次。在最后一次给药 6 h 后,将各组小鼠颈椎脱臼处死,取出股骨,常规方法收集小鼠骨髓嗜多染红细胞,经涂片、固定和瑞氏染色,显微镜 400 倍下计数微核细胞数和总核异常细胞数。每试验组计数 1 000 个细胞,计算细胞微核率和总核异常细胞率。

1.2.3 连翘苷对小鼠肝细胞 DNA 的影响

取 1.2.2 中给药处理各组小鼠肝组织,取材大小为 0.8 cm×(0.8~1.0) cm,剪碎,加入 4~5 滴 PBS 液混匀,以 1 000 r/min 离心匀浆 5 min,保留上清液。双层制胶法准备电泳试验,第一层胶用预热质量分数 0.7%正常熔点胶,待其凝固后,将小鼠肝细胞与质量分数 0.7%的低熔点琼脂糖按体积比 1:4 混匀作为第二层胶,铺在第一层胶体的载玻片上,盖上盖玻片,4 °C 凝固。经裂解、解旋后,在电压 18 V、电流 300 mA 条件下电泳 20 min。经蒸馏水中和、Goldview 染液染色后,在荧光显微镜下用 515~560 nm 的激发光观察,各组在 400 倍镜下随机选取 2 000 个细胞,观测细胞拖尾图像,统计拖尾细胞数,并计算拖尾细胞率。

1.2.4 连翘苷对小鼠精子细胞的影响 雄性小鼠分组及处理方法如 1.2.2 节。染毒后第 10 天处死小鼠,取出副睾,纵向剪开,浸泡于盛有 1 mL 生理盐水的平皿中,静置 3 min 后轻轻摇动。用四层擦镜纸过滤,吸滤液涂片。经干燥、甲醇固定、伊红染

色 1 h 后,在 400 倍镜下检查精子形态,计数头尾结构完整的精子。每只小鼠检测 1 000 个精子。

1.2.5 数据处理 用 Spss17.0 统计软件进行数据分析,试验数据以“平均值±标准差($\bar{x}\pm SD$)”表示,组间比较采用方差分析(ANOVA), $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 连翘苷对小鼠的急性毒性

试验期间,经 1 000 mg/kg 及以下剂量连翘苷染毒处理的各组小鼠均存活,无不良反应或异常行为。10 d 后测试表明,与对照组相比,各组小鼠体质量无任何差异(数据未列出)。1 500 和 1 250 mg/kg 剂量连翘苷染毒组分别有 3 只和 1 只小鼠死亡;并且存活小鼠出现体质量变化,用改良寇氏法求得半数致死量 LD_{50} 为 1 086 mg/kg。

2.2 连翘苷对小鼠骨髓嗜多染红细胞的影响

正常嗜多染红细胞是由晚幼红细胞将核排出后形成的无核细胞,如果晚幼红细胞染色体发生突变就会在嗜多染红细胞中产生微核并造成其他核异常。本试验中,经连翘苷处理的嗜多染红细胞有微核产生,典型的微核为圆形,边缘整齐,在一个细胞内有 1 个或多个微核,大小为主核的 $1/10\sim 1/5$ (图

1-A),或在有丝分裂中形成染色体断裂片段(图 1-B)。总核异常包括形成微核、染色体断裂、核空泡、核破碎等现象。经对每试验组 1 000 个嗜多染红细胞的观察和计数,连翘苷对小鼠微核和总核异常的影响如表 1 所示。表 1 表明,随着染毒剂量的增加,连翘苷染毒处理的各组小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率和总核异常率逐渐上升;与阴性对照组相比,500~1 000 mg/kg 剂量组及环磷酰胺阳性对照组微核率和总核异常率均极显著升高($P<0.01$)。说明一定剂量的连翘苷可使小鼠细胞染色体发生突变,对其遗传系统造成损伤。

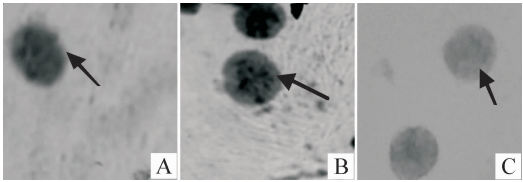


图 1 连翘苷对小鼠骨髓嗜多染红细胞的影响(400×)
A. 细胞内微核(750 mg/kg 连翘苷组);
B. 染色体断裂片段(1 000 mg/kg 连翘苷组);
C. 正常嗜多染红细胞(阴性对照组)

Fig. 1 Effect of phillyrin on bone marrow PCE in mice (400×)
A. Micronucleus in the cell (750 mg/kg phillyrin group);
B. Chromosome fragmentation (1 000 mg/kg phillyrin group);
C. Normal PCE (Negative control)

表 1 连翘苷对小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率及总核异常率的影响($n=1\ 000$)
Table 1 Effect of phillyrin on MN rate of bone marrow PCE in mice($n=1\ 000$)

组别 Group	小鼠数 Mice No.	微核率/% MN rate	总核异常率/% Tn rate	组别 Group	小鼠数 Mice No.	微核率/% MN rate	总核异常率/% Tn rate
阴性对照 Negative control	5	0.22±0.12	1.62±0.42	750 mg/kg 连翘苷组 750 mg/kg phillyrin group	6	2.13±0.21**	15.88±0.73**
250 mg/kg 连翘苷组 250 mg/kg phillyrin group	6	0.28±0.03	1.69±0.11	1 000 mg/kg 连翘苷组 1 000 mg/kg phillyrin group	6	2.28±0.22**	18.94±1.13**
500 mg/kg 连翘苷组 500 mg/kg phillyrin group	6	1.72±0.17**	13.91±1.03**	环磷酰胺 Cyclophosphamide	5	3.33±0.13**	23.57±1.02**

注:与阴性对照组相比,*表示差异显著($P<0.05$),**表示差异极显著($P<0.01$)。下表同。
Note: * and ** indicate significant ($P<0.05$) and very significant ($P<0.01$) difference compared to negative control, respectively. The same below.

2.3 连翘苷对小鼠肝细胞 DNA 的影响

染毒处理 5 d 后,经彗星电泳试验,小鼠肝细胞

的 DNA 拖尾率见表 2。

表 2 连翘苷对小鼠肝细胞 DNA 拖尾的影响($n=2\ 000$)
Table 2 Effect of phillyrin on comet assay in mice hepatic cells ($n=2\ 000$)

组别 Group	小鼠数 Mice No.	拖尾细胞率/% Comet tail rate	组别 Group	小鼠数 Mice No.	拖尾细胞率/% Comet tail rate
阴性对照 Negative control	5	0.20±0.02	750 mg/kg 连翘苷组 750 mg/kg phillyrin group	6	0.24±0.12
250 mg/kg 连翘苷组 250 mg/kg phillyrin group	6	0.26±0.03	1 000 mg/kg 连翘苷组 1 000 mg/kg phillyrin group	6	0.28±0.14
500 mg/kg 连翘苷组 500 mg/kg phillyrin group	6	0.21±0.05	环磷酰胺 Cyclophosphamide	5	3.47±0.22**

表 2 表明,连翘苷染毒处理后,随着染毒剂量的增加,各染毒组小鼠肝细胞 DNA 拖尾率与阴性对

照组相比,差异无统计学意义,且 DNA 拖尾率变化无明显规律性;环磷酰胺组肝细胞 DNA 拖尾率与

阴性对照组相比,差异极显著($P<0.01$)。说明在受试剂量下,连翘苷不会对小鼠肝细胞 DNA 造成损伤。

2.4 连翘苷对小鼠精子的影响

经对每染毒剂量约 6 000 个精子细胞的观察和计数,连翘苷对小鼠精子的影响如表 3 所示。表 3 显示,随着连翘苷染毒剂量的增加,各组小鼠精子畸

形率逐渐上升;与阴性对照组相比,500~1 000 mg/kg 3 个剂量组精子畸形率显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)高于阴性对照组,并呈现剂量效应关系,提示连翘苷在小鼠体内对生殖细胞有致突变作用。畸形精子形态异常,主要表现在头部,其次为尾部,畸形类型表现为香蕉形、无钩、胖头、双尾、尾折叠、无定形等(图 2)。

表 3 连翘苷对小鼠精子畸形率的影响($n=6\ 000$)
Table 3 Effect of phillyrin on sperms aberration rate in mice ($n=6\ 000$)

组别 Group	精子畸形率/% Sperms aberration rate	组别 Group	精子畸形率/% Sperms aberration rate
阴性对照 Negative control	3.26±0.12	750 mg/kg 连翘苷组 750 mg/kg phillyrin group	11.40±1.45**
250 mg/kg 连翘苷组 250 mg/kg phillyrin group	4.02±1.05	1 000 mg/kg 连翘苷组 1 000 mg/kg phillyrin group	22.25±0.74**
500 mg/kg 连翘苷组 500 mg/kg phillyrin group	6.25±0.85*	环磷酰胺 Cyclophosphamide	22.41±1.26**

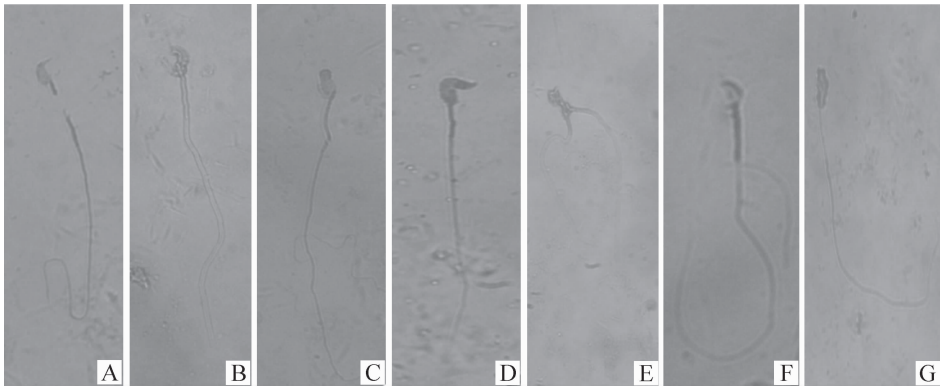


图 2 连翘苷对小鼠精子的致畸作用(400×)
A. 正常精子;B. 香蕉形精子;C. 无钩精子;D. 胖头精子;E. 双尾精子;F. 尾折叠精子;G. 无定形精子
Fig. 2 Effect of phillyrin on sperm abnormality in mice(400×)
A. Normal sperm;B. Banana shape head sperm;C. No hook sperm;D. Big head sperm;
E. Double-tailed sperm;F. Folded tail sperm;G. Amorphous sperm

3 讨论

遗传毒性研究是连翘苷非临床安全性评价的重要内容,通过对受试动物的体外和体内试验,研究连翘苷直接或间接诱导遗传学损伤的机制,是其进入临床试验及上市的重要环节。由于一种遗传毒性检测方法通常只能反映 1 个或 2 个遗传学特征,不能覆盖所有的遗传学特征,故本研究在检测连翘苷的遗传毒性时,采用了互相补充的骨髓微核试验和彗星试验,并对连翘苷的小鼠精子致突变作用进行了检测。

微核试验是检测细胞核或染色体损伤的一种遗传毒性试验方法,微核率可以反映遗传物质受伤的程度。本研究表明,连翘苷剂量达 500 mg/kg 以上时,随着剂量的增加,小鼠嗜多染红细胞微核率上

升,说明在连翘苷的作用下,嗜多染红细胞在有丝分裂后期发生了染色体片段断裂或染色体落后,这些断裂的染色体片段或落后的染色体在末期单独形成了 1 个或几个规则的次核。表明一定剂量的连翘苷可使小鼠细胞染色体发生突变,具有一定的遗传毒性。

彗星试验是一种检测单个细胞 DNA 断裂情况的技术,若细胞核受损,DNA 的降解片段在电场中泳动迁移,经染色后会看到类似彗星尾巴形状指向阳极,呈现出特有的彗星拖尾图像^[12],用该技术检测连翘苷对 DNA 的损伤作用,更加快速、简便、灵敏。研究结果显示,连翘苷染毒处理下,小鼠肝细胞 DNA 断裂数并未增加,拖尾率与阴性对照组相比,差异无统计学意义,说明在受试剂量下,连翘苷不会对小鼠肝细胞 DNA 造成损伤。

小鼠精子畸形试验可检测环境因子对生殖细胞生成和发育的影响。已知精子的畸形是决定精子形成的基因发生突变的结果,因此形态的改变提示有关基因及蛋白质产物发生了改变^[13]。连翘苷染毒处理使小鼠精子畸形率逐渐上升,表明连翘苷在雄性小鼠体内对精子有致突变作用。

按照世界卫生组织规定的化学物质急性毒性分级标准,连翘苷属于实际无毒物质^[14]。然而,高浓度的连翘苷不仅能使小鼠细胞染色体发生突变,同时对精子有致突变作用,故连翘苷的用量还需斟酌。同时,本试验结果表明,连翘苷未对小鼠肝细胞 DNA 造成损伤,提示连翘苷的遗传毒性可能是因为使相关蛋白质产物发生了改变而产生的,并无损伤遗传基因的能力,其遗传毒性产生的机理还需进一步研究。

[参考文献]

[1] 赵咏梅,李发荣,杨建雄,等. 连翘苷降血脂及抗氧化作用研究 [J]. 天然产物研究与开发,2005,17(2):157-159.
Zhao Y M, Li F R, Yang J X, et al. Study on the reducing blood lipid and antioxidation effects of phillyrin [J]. Natural Product Research and Development, 2005, 17(2): 157-159. (in Chinese)

[2] 赵咏梅,李发荣,安小宁,等. 连翘苷对小鼠减肥作用的显微观察 [J]. 天然产物研究与开发,2007,19(2):277-279.
Zhao Y M, Li F R, An X N, et al. Microscopic observing on the anti-obesity effect of phillyrin to mice [J]. Natural Product Research and Development, 2007, 19(2): 277-279. (in Chinese)

[3] 张美蓉,魏守蓉,吴燕川,等. 连翘苷对 MPP⁺ 诱导人神经母细胞株 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用 [J]. 神经药理学报, 2011, 1(4): 12-15.
Zhang M R, Wei S R, Wu Y C, et al. Effects of phillyrin on MPP⁺-induced injury in SH-SY5Y neuroblastoma cells [J]. Acta Neuropharmacologica, 2011, 1(4): 12-15. (in Chinese)

[4] Li H B, Chen F. Preparative isolation and purification of phillyrin from the medicinal plant *Forsythia suspensa* by high-speed counter-current chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1083(1/2): 102-105.

[5] Sato Y, Kumazawa N, Suzuki M, et al. Studies on chemical protectors against radiation. XXXIII: Protective mechanisms of various compounds against skin injury induced by radiation [J]. Yakugaku Zasshi, 1991, 111: 51-58.

[6] Yoshida T, Sakane N, Wakabayashi Y, et al. Thermogenic anti-obesity effects of bofu-tsusho-san in MSG-obese mice [J]. Obes Relat Metab Disord, 1995, 19: 717-722.

[7] Ernst E, Rand J I, Barnes J, et al. Adverse effects profile of the herbal antidepressant St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) [J]. Clin Pharmacol, 1998, 54: 589-594.

[8] Kang W Y, Wang J M. *In vitro* antioxidant properties and *in vivo* lowering blood lipid of *Forsythia suspense* leaves [J]. Medicinal Chemistry Research, 2010, 19(7): 617-628.

[9] 王虹,付娟. 连翘对小鼠精子畸形率的影响 [J]. 西安文理学院学报:自然科学版, 2012, 15(1): 59-61.
Wang H, Fu J. A study on the effect of weeping forsythia on sperm abnormality of mice [J]. Journal of Xi'an University of Arts & Science, Nat Sci Ed, 2012, 15(1): 59-61. (in Chinese)

[10] 万旭英,马玺里,毕洁,等. 连翘酯苷冻干粉遗传毒性试验 [J]. 毒理学杂志, 2007, 21(4): 318.
Wan X Y, Ma X L, Bi J, et al. The genotoxicity test of forsythoside gelsiccation powder [J]. Journal of Toxicology, 2007, 21(4): 318. (in Chinese)

[11] 毛东有,张中文,杨明,等. 连翘酯苷对小鼠的急性毒性及体内诱生 IFN- α 的研究 [J]. 动物医学进展, 2009, 30(6): 15-17.
Mao D Y, Zhang Z W, Yang M, et al. The acute toxicity of forsythiaside and the effects on inducing IFN-A in mice [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2009, 30(6): 15-17. (in Chinese)

[12] Pandrangi R, Petras M, Ralph S, et al. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp [J]. Environ Mol Mutagen, 1995, 26(4): 345-356.

[13] Adekunle A B, Alabi A O, Olusanmi A A. Genotoxicity assessment of a pharmaceutical effluent using four bioassays [J]. Genetics and Molecular Biology, 2009, 32(2): 373-381.

[14] 张玲,单卫华,时延增,等. 青翘和老翘中连翘苷的含量测定 [J]. 中国现代应用药学杂志, 1999, 16(1): 45-46.
Zhang L, Shan W H, Shi Y Z, et al. Determination of forsythin content in Qingqiao and Laoqiao [J]. China Academic Journal, 1999, 16(1): 45-46. (in Chinese)