

爱宁的致突变作用研究

康桦¹,张劲松¹,杨兵勋²,陈立钻²(1.浙江省药品检验所,杭州 310004; 2.浙江天皇药业有限公司,杭州 310012)

摘要:目的 检测爱宁的致突变性,以提供有关致突变的遗传毒性安全评价数据。方法 设 1, 6, 8, 40, 200 和 1000 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 5 个剂量组,进行 Ames 试验;设 0.3, 1, 3 和 9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 4 个剂量组,进行仓鼠肺成纤维细胞染色体畸变试验;设 15, 100 和 250 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 3 个剂量组,观察其对小鼠骨髓细胞微核的影响。结果 Ames 试验表明,爱宁在加和不加 S9 的条件下,对 TA97, TA98, TA100 和 TA102 菌株回复突变菌落结果为阴性。仓鼠肺成纤维细胞染色体畸变试验表明,爱宁对中国仓鼠肺成纤维细胞体外培养染色体无畸变作用。小鼠骨髓细胞微核试验表明,爱宁三个剂量组的微核出现率与阴性对照组比较无显著性差异。结论 在本实验条件下,爱宁无致突变性。

关键词:致突变; Ames; CHL; 微核

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2007)08-0686-03

Evaluation of Erianin Mutagenicity *in Vitro* and *in Vivo*

KANG Hua¹, ZHANG Jin-song¹, YANG Bing-xun², CHEN li-zuan² (1. Zhejiang Institute for Drug Control, Hangzhou 310004, China; 2. Zhejiang Tianhuang Medicinal Plant Pharmaceutical Co., Ltd, Hangzhou, 310012, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the mutagenicity of Erianin, in order to assess its safety. **METHODS** The Ames test was set up using doses of 1, 6, 8, 40, 200 and 1000 $\mu\text{g}/\text{plate}$, the CHL test, at the dose of 0.3, 1, 3 and 9 $\text{g}\cdot\text{m}^{-1}$, bone marrow cell micronuclear test in mice, at the dose of 15, 100 and 250 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. **RESULTS** The mutagenic activity of Erianin was not observed in TA97, TA98, TA100 or TA102 with or without S9 activation; In CHL test, the effect of chromosomal damage of Erianin was not found either in CHL cells; No significant difference in the micronuclear frequencies were found in any of testing groups compared with negative control in mice. **CONCLUSION** Our study showed that Erianin had no mutagenicity.

KEY WORDS: mutagenicity; Ames; CHL; micronucleus

爱宁 (Erianin) 是从中药鼓槌石斛 *Dendrobium chrysotoxum* 及其同属植物中提取而得的联苜类化合物。体外实验发现,爱宁对体外培养的人体白血病细胞株 K562 有明显的抑

制效果,对人体白血病 HL-60、人体肺腺癌 A-549、人体结肠癌 HCT-116 等肿瘤细胞株均有较强的抗肿瘤作用,对人体乳腺癌 MCF-7、人体肝癌细胞株亦有效。体内试验结果表明,

作者简介:康桦 (1975 -),女,硕士,主管药师 Tel: (0571) 86458914 E-mail: kanghua1975@126.com

爱宁具有明显的抗肿瘤作用,其中对人体肠癌、人体肺腺癌效果最好,同时还具有一定的抗肿瘤转移作用。文献报道爱宁为一种新型的肿瘤血管靶向制剂^[1],但其是否具有致突变作用还不清楚。笔者对爱宁的致突变性进行实验研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 受试物 爱宁,无色粉末,批号为 0304;爱宁注射液,为爱宁的脂肪乳剂,批号为 050125,均由浙江天皇药业有限公司提供。

1.1.2 试剂 9-氨基吡啶、2-硝基苄、甲基磺酸甲酯、1,8-二羟基蒽醌均由 Sigma 公司提供。丝裂霉素,浙江海正药业股份有限公司,批号 050501。环磷酰胺,江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 05011821。

1.1.3 菌株 细胞株和动物

鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型突变菌株 TA97, TA98, TA100 和 TA102,均由中国科学院上海药物研究所提供,经检定遗传特性及自发回变率均符合要求。中国仓鼠肺成纤维细胞 (CHL),由中国科学院上海细胞所提供。ICR 种小鼠 60 只,雌雄各半,体重 20 ~ 25 g,由浙江省实验动物中心提供,清洁级,合格证号为 SCXK(浙) 2004 - 0001。

1.2 方法

1.2.1 Ames 试验^[2-5] 试验采用平板掺入法。爱宁用 DMSO 溶解制成 1000, 200, 40, 8, 1.6 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 等 5 种不同浓度。以 DMSO 为阴性对照。阳性对照不加 S9 的 TA97 用 9-氨基吡啶 (50 $\mu\text{g}/\text{皿}$), TA98 用 2-硝基苄 (200 $\mu\text{g}/\text{皿}$), TA100 用甲基磺酸甲酯 (1 $\mu\text{L}/\text{皿}$), TA102 用丝裂霉素 (5 $\mu\text{g}/\text{皿}$)。阳性对照加 S9 的 TA97, TA98, TA100 用 2-氨基苄 (5 $\mu\text{g}/\text{皿}$), TA102 用 1,8-二羟基蒽醌 (5 $\mu\text{g}/\text{皿}$)。各组直接计数培养基上各菌株的回变菌落数。每个测试组每次做 3 个平行样本,并重复 2 次,取其平均值。

1.2.2 CHL 染色体畸变试验^[2,3,5] 根据预试验结果,爱宁表 1 爱宁 Ames 试验结果

Tab 1 Result of Erianin of Ames test

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{皿}$)	回变菌落数(个/皿)							
		TA97		TA98		TA100		TA102	
		- S ₉	+ S ₉						
爱宁	1000	143 ± 8	119 ± 9	33 ± 4	32 ± 2	174 ± 11	161 ± 72	82 ± 15	268 ± 18
	200	129 ± 11	122 ± 8	32 ± 2	33 ± 4	174 ± 13	172 ± 42	93 ± 21	298 ± 17
	40	126 ± 17	114 ± 8	31 ± 4	35 ± 4	179 ± 14	181 ± 10	299 ± 9	296 ± 12
	8	137 ± 8	123 ± 8	34 ± 3	34 ± 3	179 ± 10	164 ± 15	292 ± 19	304 ± 13
	1.6								
阴性对照	∕	127 ± 15	124 ± 11	31 ± 3	33 ± 4	168 ± 7	163 ± 13	279 ± 16	286 ± 11
9-氨基吡啶	50	327 ± 18							
2-硝基苄	200			1842 ± 199					
甲基磺酸甲酯	1 μL					834 ± 196			
丝裂霉素 C	5							1263 ± 148	
2-氨基苄	50		344 ± 23		1831 ± 86		915 ± 79		
1,8-二羟基蒽醌	50								1193 ± 134

2.2 CHL 染色体畸变试验

结果见表 2,3,加和不加 S9 条件下,受试物组染色体畸

变的细胞半数生长抑制浓度 (IC_{50}) 为 $7.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。爱宁用 DMSO 溶解,设四个给药剂量,分别为: 9, 3, 1 和 $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。溶剂对照加 DMSO,阴性对照不加任何受试物。阳性对照不加 S9 用丝裂霉素为 $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,加 S9 用环磷酰胺为 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。每个测试组采用 2 个平行培养瓶。将 5×10^4 CHL 细胞接种于 50 mL 培养瓶中,培养 72 h 后,分别加入不同浓度的爱宁。不加 S9 时,爱宁与细胞作用 24 h 及 48 h 后,分别收获细胞制片。加 S9 时,受试物、S9 混合液与细胞共同作用 6 h 后,将液体倒掉,用 PBS 洗涤细胞 3 次,加入新培养液继续培养 24 h 及 48 h 后,分别收获细胞制片。常规制片, Giemsa 染色。每一试验组每瓶选择 100 个分散良好的中期分裂相,在油镜下进行染色体畸变分析,观察染色体有无断裂,缺失,易位,互换,环,多倍体等。

1.2.3 小鼠骨髓细胞微核试验^[2-5]

将小鼠随机分为 6 组,每组 10 只,雌雄各半。分别为生理盐水阴性对照组、脂肪乳溶剂对照组、环磷酰胺阳性对照组和受试物三个剂量组。阳性对照组给予环磷酰胺 $60 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射。阴性对照组给予生理盐水 $50 \text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 静脉注射。溶剂对照组给予脂肪乳溶剂 $50 \text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 静脉注射。受试物组静脉注射给爱宁注射液,剂量为 $50 \text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,高、中、低三个剂量分别为 250, 100 和 $15 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,分别相当于人临床用量的 75, 30 和 5 倍。给药后 24 h 处死小鼠,取股骨髓制片,甲醇固定, Giemsa 染色。每只动物计数 1000 个嗜多染红细胞 (Polychromatic erythrocytes, PCE), 计算微核千

2 结果

2.1 Ames 试验

各菌落的回变菌落数见表 1。从试验结果可见,不同剂量的受试物在加和不加 S9 条件下的回变菌落数均未超过阴性对照组回变菌落数的两倍,且各剂量组间无明显的剂量反应关系。各阳性对照组在相同条件下均出现阳性结果。

变率在正常范围内,与阴性对照组比较无显著性差异。阳性对照组丝裂霉素和环磷酰胺染色体畸变率显著增加,与阴性

对照组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。

表 2 爱宁 CHL 细胞染色体畸变实验结果 (- S9)

Table 2 Result of Erianin of chromosomal damage in CHL cells (- S9)

组别	剂量 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	观察 细胞数 / 个	染色体畸变数 / 个		畸变率 / %	
			24 h	48 h	24 h	48 h
阴性对照	0	200	3	0	1.5	0
溶剂对照	0.1 mL 瓶	200	2	2	1.0	1.0
阳性对照 (丝裂霉素)	0.3	200	67	68	33.5	34.0
爱宁	9	200	4	2	2.0	1.0
	3	200	4	5	2.0	2.5
	1	200	0	3	0	1.5
	0.3	200	3	0	1.5	0

表 3 爱宁 CHL 细胞染色体畸变实验结果 (+ S9)

Table 3 Result of Erianin of chromosomal damage in CHL cells (+ S9)

组别	剂量 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	观察 细胞数 / 个	染色体畸变数 / 个		畸变率 / %	
			24 h	48 h	24 h	48 h
阴性对照	0	200	2	0	1.0	0
溶剂对照	0.1 mL 瓶	200	3	0	1.5	0
阳性对照 (环磷酰胺)	40	200	92	71	46.0	35.5
爱宁	9	200	4	5	2.0	2.5
	3	200	5	2	2.5	1.0
	1	200	2	2	1.0	1.0
	0.3	200	2	1	1.0	0.5

2.3 小鼠骨髓细胞微核试验

受试物各剂量组与对照组小鼠微核率见表 4, 用卡方检验统计, 各剂量组微核率和阴性对照组比较, 差异无统计学意义。阳性对照组与阴性对照组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。

表 4 爱宁小鼠骨髓微核试验结果

Table 4 The effect of Erianin to mice bone marrow cell micronucleus

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	动物数 只	PCE 数 个	微核数 个	微核率 / %
阴性对照	50 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$	10	10000	23	2.3 \pm 0.7
溶剂对照	50 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$	10	10000	20	2.0 \pm 1.1
阳性对照 (环磷酰胺)	60	10	10000	288	28.8 \pm 3.1
爱宁	250	10	10000	22	2.2 \pm 1.0
	100	10	10000	21	2.1 \pm 1.2
	15	10	10000	23	2.3 \pm 1.2

3 讨论

本实验对爱宁进行了临床前毒理学评价, 用 3 种对遗传物质不同作用终点的短期测试方法进行检测, 包括基因突变和染色体畸变, 体内试验和体外细胞培养试验, 体外微生物回复突变试验。结果表明爱宁在本实验系统中无致突变作用。

参考文献

- [1] GONG Y Q, FAN Y, WU D Z, *et al.* *In vivo* and *in vitro* evaluation of erianin, a novel anti-angiogenic agent [J]. *European Journal of Cancer*, 2004, 40: 1554-1565.
- [2] 袁伯俊, 王治乔. 新药临床前安全性评价与实践 [M]. 军事医学科学出版社, 1997: 78-110.
- [3] 胡秀敏, 张冰冰, 俞丽霞, 等. “冻干江浙蛇毒”的致突变作用研究 [J]. *浙江中医学院学报*, 2005, 26(6): 90-92.
- [4] 夏勇, 李敏红, 郑云燕, 等. 一种孕宝营养液致畸和遗传毒性的检测 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2006, 18(3): 234-237.
- [5] 朱心强, 祝慧娟, 沈玲玲, 等. 氟康唑的致突变研究 [J]. *癌变畸变突变*, 1994, 6(6): 60-62.

收稿日期: 2007-01-06