

钩吻急性毒性快速检测方法研究

黄美霞¹, 洪怀山², 廖华军¹, 王英豪¹, 李德森¹, 吴水生^{1*} (1.福建中医药大学药学院, 福州 350108; 2.福建省立医院/福建省立金山医院泌尿外科, 福州 350028)

摘要: 目的 建立以秀丽隐杆线虫为模式生物的钩吻急性毒性快速筛选方法。方法 将线虫同步化到 L₄ 期, 优化体系 DMSO 浓度、吐温-80 用量、染毒时间, 确定最优实验条件, 建立以秀丽隐杆线虫为模式生物的钩吻急性毒性快速筛选方法。结果 以 M9 缓冲液为基本培养液, 秀丽隐杆线虫在钩吻粗提物溶液中暴露 72 h 的 LC₅₀ 为 39.722 mg·mL⁻¹ (95% 置信限 33.802~45.985 mg·mL⁻¹)。结论 该方法简便, 快速, 试验周期短, 样品用量少, 该方法可作为钩吻急性毒性研究中钩吻毒性变化的快速判断方法。

关键词: 钩吻; 秀丽隐杆线虫; 急性毒性; 快速检测

中图分类号: R285.5 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)02-0244-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.02.020

引用本文: 黄美霞, 洪怀山, 廖华军, 等. 钩吻急性毒性快速检测方法研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(2): 244-247.

Rapid Detection Method of Acute Toxicity of *Gelsemium Elegans*. Benth

HUANG Meixia¹, HONG Huaishan², LIAO Huajun¹, WANG Yinghao¹, LI Desen¹, WU Shuisheng^{1*} (1.School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China; 2.Department of Urology, Fujian Province-owned Hospital/Fujian Provincial Jinshan Hospital, Fuzhou 350028, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for rapid screening of the acute toxicity of *Caenorhabditis elegans* with *Gelsemium elegans*. Benth as model organism. **METHODS** The *Caenorhabditis elegans* were synchronized to L₄ phase. The optimal experimental condition were determined by optimizing the DMSO concentration, Twain-80 dosage and exposure time. A rapid screening method of acute toxicity of *Caenorhabditis elegans* with *Gelsemium elegans*. Benth model organisms was established. **RESULTS** With M9 buffer medium as basic medium, the LC₅₀ of *Caenorhabditis elegans* in gelsemine crude extract solution for 72 h was 39.722 mg·mL⁻¹ (95% confidence limit was 33.802–45.985 mg·mL⁻¹). **CONCLUSION** The method is simple, rapid, short test period, small amount of sample, this method can be used as a rapid method to judge the change in toxicity study on acute toxicity of *Gelsemium gelsemium*.

KEY WORDS: *Gelsemium elegans*. Benth; *Caenorhabditis elegans*; acute toxicity; rapid detection

秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*) 是一种经典的模式生物, 因其结构简单、通体透明、繁殖快、生命周期短和易于实验室培养, 被广泛用于生命科学等领域。近年来, *C. elegans* 又被用于药物筛选研究和环境毒性检测与生态毒理学研究^[1]。研究表明线虫与小鼠相比, 对药物毒性更敏感, 并且大部分药物在线虫评价体系中呈现的毒性大小, 与小鼠评价体系相类似, 即 2 种评价系统具有较好的正相关性^[2]。

钩吻 [*Gelsemium elegans*. Benth.] 又名大茶叶、大茶药、断肠草等, 为马钱科植物胡蔓藤的全草, 是世界闻名的剧毒植物^[3]。我国对钩吻的研究历史悠久, 首载于《神农本草经》, 列为下品, 谓其“主

金疮, 乳疮, 中恶风, 咳逆上气, 水肿, 杀鬼疰蛊毒”。因其毒性, 我国民间一直以外用为主, 具有祛风攻毒, 散结消肿, 止痛、杀虫止痒的功效。现代药理研究表明钩吻在止痛、抗炎、抗肿瘤方面具有显著的效果^[4-7], 有关钩吻抗肿瘤及镇痛作用的应用已有大量报道。然而, 钩吻毒性极大, 治疗量和中毒量非常接近, 安全指数小, 临床上不乏钩吻的中毒报道^[8]。本课题组研究团队采用炮制和配伍玉叶金花减毒存效方面进行了系列研究, 随着减毒研究的进行, 实验中用到大量的实验动物。根据实验动物的 3R (Reduction、Refinement 和 Replacement) 原则, 本研究拟建立线虫模型以对钩吻急性毒性变化进行快速筛选与监测, 以期望

基金项目: 福建省科技厅资助课题(2015J01329); 福州市食用菌产业发展项目(榕农函[2017]365号)

作者简介: 黄美霞, 女, 硕士, 讲师 Tel: (0591)22861135 E-mail: 67657674@qq.com *通信作者: 吴水生, 男, 博士, 教授 Tel: (0591)22861135 E-mail: 498366498@qq.com

减少生命科学研究中实验小鼠的使用量,同时借助线虫自身生长周期短的优势,缩短试验周期。迄今为止,该研究尚未见报道,本研究将为今后线虫作为毒性中药炮制减毒研究中急性毒性模式生物的选择提供借鉴。

1 材料

1.1 菌株、线虫

大肠杆菌 OP50、野生型秀丽隐杆线虫 Bristol (N2)均由第二军医大学药学院王彦教授惠赠。

1.2 仪器与试剂

NaCl、KCl、NaClO、NaOH、CaCl₂、MgSO₄、CuSO₄·5H₂O、DMSO(批号:0666C081)均购自美国 Sigma 公司;吐温-80(上海国药集团,批号:304A057)。

BS2105 型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司);Vartev Genie2 漩涡震荡仪(美国 Scientific Industries 公司);3520 离心机(日本久保田公司);ZWY-103D 恒温摇床(上海智诚公司);CLASS II TYPE A2 超净工作台(北京东联哈尔滨仪器制造有限公司);HPX-300BSH-III 恒温恒湿箱(上海新苗医疗器械制造有限公司);SMZ745T 体视显微镜(日本尼康)。

2 方法

2.1 秀丽隐杆线虫的基本培养及同期化

2.1.1 基本培养基、缓冲溶液的配制 NGM 培养基:称取 3.0 g NaCl, 8.5 g 琼脂粉, 1.25 g 胰蛋白胍于 1 L 三角烧瓶中,加蒸馏水 488 mL,混匀,115 °C 灭菌 40 min。冷却至约 55 °C 后,在无菌条件下,分别加入 5 mg·mL⁻¹ 胆固醇乙醇溶液 0.5 mL, 1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 12 mL, 1 mol·L⁻¹ CaCl₂ 和 1 mol·L⁻¹ MgSO₄ 各 0.5 mL,混匀后,铺皿。

LB 培养基:LB15 g,加蒸馏水 600 mL,121 °C 灭菌 20 min,置于室温冷却。

M9 缓冲溶液:3 g KH₂PO₄, 6 g Na₂HPO₄, 5 g NaCl,加水至 1 L,121 °C 灭菌 20 min,冷却后加入 1 mL 1 mol·L⁻¹ MgSO₄。

2.1.2 秀丽隐杆线虫的基本培养 秀丽隐杆线虫涂布于大肠杆菌 OP50 的标准线虫培养基(NGM)中,20 °C 培养;大肠杆菌 OP50 采用 LB 培养基培养。

2.1.3 秀丽隐杆线虫的同期化处理 从平板上收集孕虫,清洗,最后剩约 500 μL 虫悬液,之后加入 400 μL 漂白剂(5%NaClO)和 100 μL 5 mol·L⁻¹

NaOH,漩涡振荡 3~4 min 至虫体大部分溶解,然后加入无菌水稀释,1 300 r·min⁻¹ 离心 1 min,弃上层液体,再清洗 1 次,收集同步化生长的虫卵。将虫卵置于 M9 缓冲液中 15 °C 过夜孵育至 L₁ 期。之后,将 L₁ 期线虫转接到覆有大肠杆菌 OP50 的 NGM 培养基上,25 °C 培养 48 h 到 L₄ 期(不孕阶段),用 M9 缓冲液将其从平板上洗下,用 M9 缓冲液将同步化的 L₄ 期幼虫从培养基上洗下,静置虫液 10 min 后,吸去上层大部分含大肠杆菌的液体,用 M9 缓冲液重悬至每 20 μL 液体中大约含有 30 条 L₄ 期幼虫,收集虫体进行药物急性毒性实验。本实验全部采用处于幼虫发育后期 L₄ 期的线虫进行毒性考察实验。

2.1.4 线虫的运动行为 观察运动行为采用身体弯曲次数进行评价,随机选取视野中 5 只线虫。测试线虫自加入实验体系中起 20 s 内,身体弯曲的次数,以线虫身体形成的 S 型中轴线为轴,向前行进一个正弦波形的过程定义为一次成功的身体弯曲^[9]。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 钩吻粗提物的制备 取钩吻干燥藤茎,粉碎成 40 目左右的细粉,加入 90%乙醇,回流提取 1 h,提取液趁热用布氏漏斗抽滤,残渣同法再提取 1 次,合并滤液用真空旋转蒸发器减压回收乙醇,冷冻干燥成钩吻浸膏冻干粉末,4 °C 下保存。使用时用 DMSO 溶解配置成 3.2 g·mL⁻¹ 药材储备液。临用前,加 M9 稀释成所需浓度,0.45 μm 滤膜过滤除菌。

2.2.2 DMSO 浓度的考察 取无菌的 12 孔板,每孔加入 M9 溶液 2 mL,分别加入 DMSO 溶液 0, 5, 10, 25, 50, 100, 200 μL,使 DMSO 的百分比浓度分别为 0, 0.25%, 0.5%, 1.25%, 2.5%, 5%, 10%,每个 DMSO 浓度分别做 6 个复孔。显微镜下,各孔加入线虫 20 条,观察 72 h 内线虫的运动行为及死亡情况,实验以线虫身体僵直,用探针触碰没有反应,判定为死亡。

2.2.3 吐温-80 浓度的考察 取无菌的 12 孔板,每孔加入 M9 溶液 2 mL,加入“2.2.2”实验条件下所得的 DMSO 最适浓度,混匀。再分别加入吐温-80(0, 5, 10, 25, 50, 100 μL),使吐温-80 的百分比浓度分别为 0, 0.25%, 0.5%, 1.25%, 2.5%, 5%,并超声均匀,每个浓度分别做 6 个复孔。体视显微镜下,各孔加入线虫 20 条,观察线虫的运

动行为及死亡情况，线虫身体僵直，用探针触碰没有反应，判定为死亡。

2.3 不同浓度的钩吻醇提溶液对线虫的不良反

实验时，配制梯度浓度的钩吻药材粗提物。先在 12 孔板中加入 2 mL 线虫基本培养基，加入 100 μL 吐温-80，超声混匀。将 100 μL 配制好的待测药物溶液加入无菌的 12 孔板中，使药物考察的终浓度分别为 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，每个剂量设 6 个平行复孔。在给药后 2, 4, 12, 24, 48, 72 h 观察，统计线虫死亡数，另外进行 2 次重复性实验。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行数据处理，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，概率分析计算线虫暴露于钩吻提取液中 72 h 后的 LC_{50} 和 95% 可信限，两两比较采用 t 检验， $P < 0.05$ 时认为有显著性差异。

3 结果

3.1 DMSO 对线虫生长的影响考察结果

线虫加入 DMSO-M9 缓冲体系 1 h 后在显微镜下观察，DMSO 百分含量为 0.25%, 0.50%, 1.25% 组内线虫摆头频率与空白组无显著性差异。而 DMSO 用量为 2.5%, 5%, 10% 组里的线虫较不活跃，尤其是 DMSO 5%, 10% 孔里的线虫缩成小圈，并静止不动，与空白组相比存在显著差异 ($P < 0.05$)；各组线虫摆头频率见图 1。

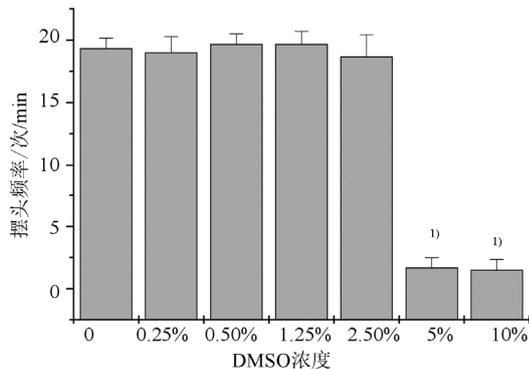


图 1 不同浓度 DMSO 暴露 1 h 对线虫运动行为的影响与空白组相比较，¹⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 1 Effect of different concentrations of DMSO on the activity of *C. elegans* in 1 h Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$.

暴露 24 h，可见 DMSO 2.5% 组内线虫恢复运动，线虫摆头频率与空白组无显著性差异；而 DMSO 高剂量组(5%, 10%)组内的线虫虽然恢复条形、活跃度有所增加，但仅现轻微摆动，直至 72 h，

高剂量组线虫活跃度仍然未见改善。自 24 h 起，高剂量组(5%, 10%)组内分别出现少数线虫僵直死亡，其余实验组在观察周期 72 h 内未见线虫死亡。各组的 24, 48, 72 h 线虫存活率见图 2。

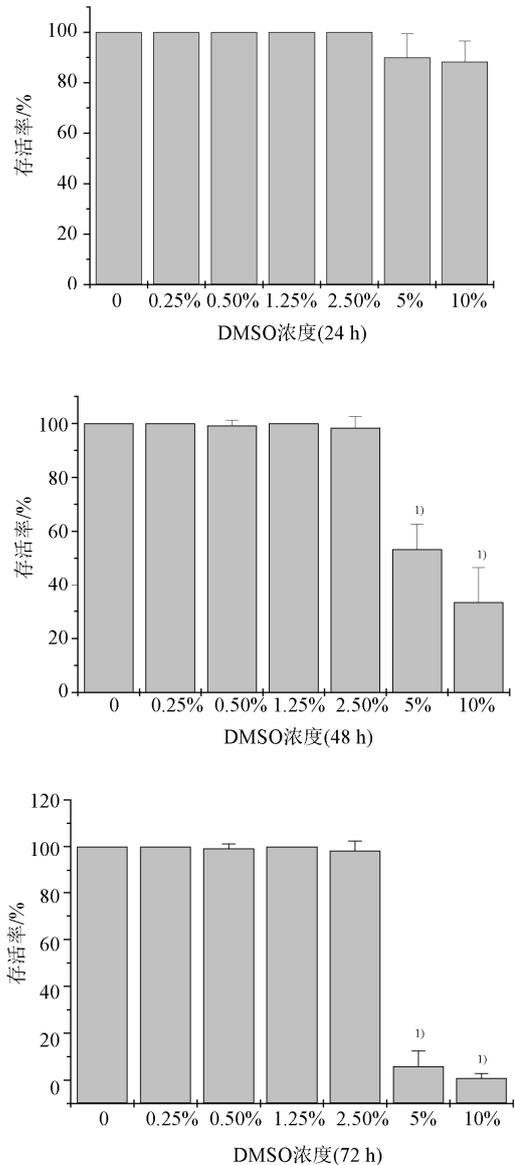


图 2 不同浓度 DMSO 暴露 24, 48, 72 h 线虫存活率与空白组相比较，¹⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 2 Effect of different concentrations of DMSO on the activity of *C. elegans* in 24, 48, 72 h Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$.

以上结果显示，DMSO 含量 $\leq 2.5\%$ 时，在 72 h 内不影响线虫的运动行为和存活率，DMSO 百分含量达 5%, 10% 时对线虫运动、存活率均有影响，随着暴露时间变长，线虫死亡率越大。

3.2 吐温-80 用量考察

加样后 1, 24, 48, 72 h 观察线虫的运动情况与存活率。在 72 h 内，所有实验组的线虫摆头次

数与空白组相比,无显著差异,各实验组未见线虫死亡。提示实验条件下吐温-80用量达5%,在72 h内不影响线虫行为及存活率。

3.3 钩吻醇提取物致秀丽隐杆线虫急性毒性测定结果
加药 2, 4 h, 显微镜下观察, 各实验组线虫的摆头频率与空白组无显著差异; 24 h 观察, 未加钩吻的溶剂空白(M9+DMSO+吐温)组线虫活动性未发生明显变化, 但加样浓度 $>20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 各实验组内出现少数线虫僵直、死亡, 在随后的 48, 72 h 观察到, 线虫死亡数量与加药时间成正相关。各组 24, 48, 72 h 存活率见表 1。

表 1 不同剂量钩吻浸膏暴露 24, 48, 72 h 对线虫存活率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

Tab. 1 Effect of different concentrations of *Gelsemium elegans* Benth on the survival rate of *C. elegans* in 24, 48, 72 h ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

浓度/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	存活率/%		
	24 h	48 h	72 h
0	99.17 \pm 1.86	99.17 \pm 1.86	99.17 \pm 1.86
5	99.17 \pm 2.36	97.50 \pm 2.50	89.17 \pm 5.34
10	96.67 \pm 5.53	91.67 \pm 5.53	79.17 \pm 9.75
20	94.17 \pm 7.31	80.83 \pm 6.72	64.17 \pm 7.31
30	85.00 \pm 5.77	74.17 \pm 7.31	56.67 \pm 12.47
40	78.33 \pm 7.45	72.50 \pm 9.46	52.50 \pm 13.15
50	81.67 \pm 9.86	65.00 \pm 9.13	43.33 \pm 13.74
60	80.86 \pm 6.72	61.67 \pm 9.43	34.17 \pm 14.55
70	80.83 \pm 6.72	54.17 \pm 6.07	15.00 \pm 10.41
80	50.83 \pm 16.69	36.67 \pm 6.24	2.50 \pm 3.82

以 72 h 各组线虫的存活率, 采用 SPSS 20.0 软件概率分析计算线虫在钩吻中 LC_{50} 为 $39.722 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (95%置信限 33.802~45.985 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

4 讨论

4.1 DMSO 含量对线虫活动和存活率的影响

本研究探讨了采用秀丽隐杆线虫作为钩吻毒性变化快速判断模式生物的实验方法, 因钩吻 90%粗提取物中, 多数为水溶性差的生物碱类物质, 而线虫染毒实验时 M9 缓冲体系为水溶液, 故采用 DMSO 将钩吻浸膏冻干粉末溶解。考虑到 DMSO 的浓度将影响线虫的生长、发育行为, 故实验考

察 DMSO 含量对线虫生长的影响。实验结果表明, DMSO 百分浓度为 2.5%、吐温-80 5%不影响线虫的运动和存活率。实验以含有 DMSO 2.5%、吐温-80 5%的基本培养基为溶剂空白对照, 72 h 试验周期内, 线虫的存活率与钩吻浓度成相关性。

4.2 实验周期的优化

在本研究中, 发现最佳观察周期为 72 h。当给药 24, 48 h, 各实验组未达到半数致死浓度。但当观察周期超过 72 h, 达到 96 h, 加钩吻低剂量($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)组与未加钩吻空白组线虫存活率依然没有明显区别, 但镜下观察到各组存活的线虫体长变长, 颜色变浅, 活动性变差。钩吻加样浓度超过 $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组内存活的线虫均出现“wormbag”, 提示钩吻对线虫的排卵能力亦有影响, 有待另文研究。该方法的建立可作为钩吻炮制减毒研究中毒性变化的一种快速监测方法。

REFERENCES

- [1] 丁晓霞. 以秀丽隐杆线虫作为模式生物对雄黄微生物浸出液活性和毒性的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2009.
- [2] LI Y, GAO S, JING H M, et al. Correlation of chemical acute toxicity between the nematode and the rodent [J]. *Toxicol Res*, 2013, 2(6): 403-412.
- [3] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编: 下册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983: 118-121.
- [4] WANG Y H, WU S S, LI D S, et al. Uniform design research on the compatibility toxicity of *Gelsemium elegans* Benth. and *Mussaenda pubescens* [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2016, 33(2): 150-154.
- [5] XU Y K, LIAO S G, NA Z, et al. Gelsemium alkaloids, immunosuppressive agents from *Gelsemium elegans* [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(6): 1120-1124.
- [6] LIU M, HUANG H H, YANG J, et al. The active alkaloids of *Gelsemium elegans* Benth are potent anxiolytics [J]. *Psychopharmacology*(Berl), 2013, 225(4): 839-851.
- [7] LIU M, SHEN J, LIU H, et al. Gelsenicine from *Gelsemium elegans* attenuates neuropathic and inflammatory pain in mice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(12): 1877-1880.
- [8] 陈仕生, 陈业荷, 徐志权. 钩吻中毒的临床特点及救治探[J]. *中国急救医学*, 2006, 26(4): 298-300.
- [9] LIU H C, XUE T, WU Z P, et al. Toxicity of dopamine hydrochloride to *Caenorhabditis elegans* [J]. *Chin Heal Standard Manag*(中国卫生标准管理), 2015, 33(6): 4-7.

收稿日期: 2017-04-05

(本文责编: 李艳芳)