

柿叶提取物对小鼠急性毒性和遗传毒性研究^{*}

□吴 睿 (教育部(省部共建)中药资源科学重点实验室 广州 510006)
(广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心)

覃仁安 尹仁杰 王德勤^{**} 李楚源^{**}
(广州白云山和记黄埔中药有限公司 广州 510515)

摘 要:目的:研究柿叶提取物的急性毒性及遗传毒性。方法:对柿叶提取物进行急性经口毒性测定,并通过小鼠骨髓微核实验及小鼠精子畸形实验对其遗传毒性进行评价。结果:小鼠柿叶提取物的最大耐受剂量大于 597.2 g 生药/kg,为临床成人用药量的 2150 倍;小鼠骨髓细胞微核实验和精子畸形实验结果均显示柿叶提取物 3 个剂量组的微核率、精子畸形率与阳性对照组比较均有显著性差异($P<0.01$)。结论:在本实验条件下,柿叶提取物对小鼠口服的毒性较小,未见明显的遗传毒性。

关键词:柿叶提取物 微核 急性毒性 精子畸变

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2012.06.019

柿叶为柿树科 (*Ebenaceae*) 植物柿树 (*Diospyros Kaki* Thunb.) 的新鲜或者干燥叶,其入药始载于明代《滇南本草》“经霜叶敷臃疮”^[1]。现代研究表明,柿叶中含有黄酮类、萜类、香豆素、萘醌、萘酚、有机酸、挥发油等化学成分,具有清肺止咳、凉血止血、活血化痰、降血压等功效^[2]。临床上主要用于治疗冠心病、胃溃疡出血、功能性子宫出血、心绞痛、缺血性脑中风等病症。有关柿叶急性毒性和遗传毒性研究报道较少,本文对柿叶提取物急性毒性和遗传毒性进行研究,为指导临床用药及其安全性评价提供实验依据。

一、材料与方法

1. 实验材料

(1) 受试物。

柿叶提取物由广州白云山和记黄埔中药有限公司提供。制法:取 5 kg 柿叶去杂质,洗净切碎,用水提醇沉法提取,减压干燥,回收乙醇,得到纯干膏约 0.18 kg(收率约为 3.6%),再用玉米油配制成各实验组所需浓度的受试物。

(2) 实验动物。

SPF 级健康 NIH 小鼠,6~8 周龄,体重 18~22 g,由广东省医学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(粤)2003-0002。动物实验室为 SPF 级,室温

收稿日期:2012-03-21

修回日期:2012-05-02

* 科学技术部国家“十一五”科技重大专项(2009ZX09103-305)治疗缺血性中风新药 BYS-HWL01 的研究,负责人:李楚源。

** 通讯作者:王德勤,高级制药工程师,主要研究方向:中药研发与管理,E-mail: wangdeqin@813zy.com;李楚源,本刊编委,高级经济师,广州医药集团有限公司总经理,广州白云山和记黄埔有限公司总经理,主要研究方向:新药研发与大品种二次开发,Tel: 020-81218016,E-mail: lichuyuan@813zy.com。

22℃±2℃环境中,相对湿度 50%~70%。实验动物使用许可证号:SYXK(粤)2003-0011。颗粒饲料由广东省医学动物实验中心提供。

(3)主要仪器与试剂。

Sigma1-15K 台式冷冻离心机、BS2202S 型 Sartorius 电子天平。环磷酰胺由山西普德药业有限公司提供,小牛血清由杭州四季青生物工程材料有限公司提供,Giemsa 染料由上海试剂三厂提供,伊红染料由上海三爱思有限公司提供。

2. 方 法

(1)小鼠急性毒性实验。

参照《中药、天然药物急性毒性研究技术指导原则》*和 Horn's 法实验。选择 NIH 种小鼠 40 只,体重 18~22 g,随机将动物分为 4 个剂量组,每组 10 只,雌雄各半,禁食不禁水 16 h 后,按 2.15、4.64、10.0、21.5 g·kg⁻¹ BW 剂量灌胃给予受试物,灌胃量 0.20 mL/10 g BW,观察 2 周,并记录中毒和死亡情况。

(2)小鼠骨髓微核实验。

参照《药物遗传毒性研究技术指导原则》** ,选择 NIH 种小鼠 50 只,体重 25~30 g,按随机方法将小鼠分为 5 组,分别为阴性对照组、高剂量组、中剂量组、低剂量组和阳性对照组,每组 10 只,雌雄各半。阴性对照组采用生理盐水,高、中、低剂量组实验剂量分别为 2.50、5.00、10.0 g·kg⁻¹ BW,阳性对照组用环磷酰胺 40 mg·kg⁻¹ BW 经口染毒。按 30 h 给受试物方法实验:分两次灌胃,灌胃量 0.20 mL/10 g BW,于第 2 次灌胃 6 h 后,处死小鼠取胸骨骨髓,用小牛血清稀释图片,甲醇固定,Giemsa 染色 10 min,自来水冲洗,自然干燥后在光学显微镜下观察。

选择分散均匀,染色良好的细胞,每只动物计数 1000 个嗜多染红细胞(Polychromatic erythrocytes, PCE),观察含有微核的嗜多染红细胞数,计算微核率,以千分率表示;计数 200 个嗜多染红细胞,计算嗜多染红细胞与成熟正染红细胞(Normochromatic Erythrocytes, NCE)的比例(PCE/NCE)。

(3)小鼠精子畸形实验。

选择 NIH 种雄性小鼠 25 只,体重 25~35 g,随机分为 5 组,分别为阴性对照组、高剂量组、中剂量组、低剂量组和阳性对照组,每组 5 只,阴性对照组采用生理盐水,高、中、低剂量组实验剂量分别为

0.25、0.50、10.0 g·kg⁻¹ BW,阳性对照组用环磷酰胺 50 mg·kg⁻¹ BW 经口染毒。按上述剂量连续灌胃 5 天,灌胃量 0.20 mL/10 g BW,于末次灌胃后的第 30 天处死动物,取两侧附睾,置于加有 2 mL 生理盐水的平皿中,用眼科剪将附睾纵向剪 1~2 刀,静置 3~5 min,轻轻摇动,用 4 层擦镜纸过滤,吸滤液涂片、干燥后甲醇固定 5 min,2%伊红染色 1 h,用水轻轻冲洗、干燥。每只动物计数 1000 个结构完整的精子,计算畸形精子发生率。

3. 统计方法

计量资料数据均用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS11.0 统计软件分析处理。体重统计采用多组均数分析,PCE/NCE 比值采用单因素方差分析,方差齐用 LSD,方差不齐用 Tamhane's T2;微核发生率用泊松分布;精子畸形发生率用 Wilcoxon 秩和方法统计检验。

二、结 果

1. 急性毒性实验

实验期间未观察到动物出现不良反应或死亡。14 天后处死,解剖,肉眼观察小鼠各内脏外形、颜色、质地、大小等均未见异常。可知柿叶提取物急性 LD₅₀ 雌雄均大于 21.5 g·kg⁻¹(相当于生药 597.2 g·kg⁻¹),按照急性毒性分级标准^[3],柿叶提取物属无毒级(见表 1)。

2. 小鼠骨髓微核实验

柿叶提取物各剂量组的微核率与阴性对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),而各剂量组和阴性对照组微核率均显著低于环磷酰胺组($P<$

表 1 柿叶提取物急性毒性实验结果($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

性别	剂量(g·kg ⁻¹)	实验前体重(g)	实验后体重(g)
♂	21.5	19.29±0.74	27.75±2.97
	10.0	19.45±0.81	27.43±2.96
	4.64	19.17±0.76	27.52±2.84
	2.15	19.79±1.53	29.41±4.03
♀	21.5	19.75±1.40	25.78±3.92
	10.0	20.03±1.71	26.95±3.94
	4.64	20.70±1.42	26.13±2.52
	2.15	19.85±1.29	25.80±4.23

* 中药、天然药物急性毒性研究技术指导原则. 编号:【Z】GPT2-1.2005:3.

** 药物遗传毒性研究技术指导原则. 编号【ZH】GPT2-1.2007.

0.01), 各组 PCE/NCE 比值均在正常范围内, 提示受试物柿叶提取物对体细胞无诱变作用(见表 2)。

3. 小鼠精子畸形实验

柿叶提取物各剂量组精子畸形率与阴性对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$), 而各剂量组和阴性对照组精子畸形率均显著低于环磷酰胺组($P<0.01$)。提示柿叶提取物对小鼠精子不产生畸变作用(见表 3)。

三、讨 论

自 20 世纪 80 年代起, 柿叶茶风靡日本, 至今仍兴盛不衰。在印度传统医药中, 柿叶也被广泛用作利尿剂、轻泻剂、止血剂等, 用于治疗夜盲症, 提高视力。在我国一些地方也有饮柿叶茶的习惯, 因其具有降压降脂、生津止渴、利尿、消肿、清热解毒等作用, 对“三高”人群、糖尿病患者、脑动脉栓塞、慢性肾炎等均有疗效。由柿叶开发成的“脑心清”等

名优中成药已在临床上应用多年, 并有良好疗效^[4]。陈壁峰等^[5]研究表明柿叶乙醇提取物对大鼠 90 天亚慢性毒性和致畸作用, 但对于柿叶及其提取物急性毒性和生殖毒性研究相对报道较少。

最大给药量被选为动物的终身实验剂量, 能检测出任何可能存在的致癌危险性, 是急性毒性实验最常用的参数之一, 也是小鼠骨髓微核实验分组的依据^[6]。微核实验是目前筛选药物遗传毒性快速、敏感的常规方法之一, 主要检测 DNA 断裂和非整倍体诱变, 可反映出所检测药物对实验性小鼠的遗传毒性。精子畸变实验是判断药物是否具有生殖毒性常采用的方法, 以精子畸变率来评价外来药物的生殖毒性和诱变性^[7]。在本实验设计的剂量范围内, 给予推荐日剂量 2150 倍剂量的柿叶提取物, 小鼠未见急性毒性反应, 小鼠骨髓微核率与精子畸形率亦未见有遗传毒性, 提示该柿叶提取物安全性良好。本实验对柿叶提取物的毒性作用进行了基础安全性研究, 为今后合理开发和利用柿叶及其提取物提供了理论和科学实验依据。

参考文献

- 1 兰茂(明), 《滇南本草》整理组整理. 滇南本草(第一卷). 云南: 云南人民出版社, 1975:332~335.
- 2 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准(1990 版). 广西: 广西科学技术出版社, 1992:70~71.
- 3 张桥. 卫生毒理学基础(第 3 版). 北京: 人民卫生出版社, 2001:84~249.
- 4 姜红波, 赵卫星, 冯国栋, 等. 柿叶的主要有效成分及药理作用研究进展. 化工时刊, 2010, 24(6):38~44.
- 5 陈壁峰, 黄俊明, 贝伟剑, 等. 柿叶乙醇提取物 90 天亚慢性毒性和致畸作用的实验. 1995, 19(3):326~327.
- 6 顾祖维. 现代毒理学概论. 北京: 化学工业出版社, 2005:1.
- 7 袁伯俊. 新药临床前安全性评价与实践. 北京: 军事医学科学院出版社, 1997:11.

表 2 柿叶提取物小鼠骨髓微核实验结果($n=10$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	嗜多染红细胞数		微核数		微核率(‰)		PCE/NCE	
		♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
高剂量组	10.0	5000	5000	11	13	2.2	2.6	0.74	0.78
中剂量组	5.00	5000	5000	12	9	2.4	1.8	0.76	0.82
低剂量组	2.50	5000	5000	8	10	1.6	2.0	0.74	0.76
阴性对照组	生理盐水	5000	5000	9	10	1.8	2.0	0.74	0.77
阳性对照组	0.04	5000	5000	127	162	25.4**	32.4**	0.76	0.78

注: 与阴性对照组比较, ** $P<0.01$ 。

表 3 柿叶提取物对小鼠精子畸形实验结果($n=5$)

组别	剂量($g \cdot kg^{-1}$)	精子数	畸形精子数	精子畸形率(‰)
高剂量组	10.0	5000	72	14.4
中剂量组	5.00	5000	80	16.0
低剂量组	2.50	5000	69	13.8
阴性对照组	生理盐水	5000	73	14.6
阳性对照组	0.05	5000	382	76.4**

注: 与阴性对照组比较, ** $P<0.01$ 。

Experimental Study on Acute Toxicity and Genetic Toxicity of *Diospyros Kaki* Extract

Wu Rui^{1, 2}, Qin Ren'an³, Yin Renjie³, Wang Deqin³, Li Chuyuan³

(1. Key Laboratory of Chinese Medicine Resources under Ministry of Education, Guangzhou University of Chinese

[World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 2203

Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. *Research Centre of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;*

3. *Hutchison Whampoa Guangzhou Baiyunshan Chinese Medicine Company Limited, Guangzhou 510515, China)*

Abstract: This study was aimed to observe the acute oral toxicity and genetic toxicity of *Diospyros kaki* Extract. Acute oral toxicity test was performed in mice. The genetic toxicity of *Diospyros kaki* Extract was evaluated by bone marrow micronucleus and sperm shape abnormality test (*Diospyros kaki* Extract was administered to mice at the dosage of 0.00, 0.25, 5.00, and 10.0 g/kg BW). The results showed that the acute oral maximum-tolerated dose of *Diospyros kaki* Extract was greater than 597.2 g/kg, which was 2150 times of the clinical dosage. There were significant statistical differences between each dosage group and positive control group ($P < 0.01$) in bone marrow micronucleus and sperm shape experiment. It was concluded that the *Diospyros kaki* Extract was classified as non-toxic substance. There was no genetic toxicity produced.

Keywords: *Diospyros kaki* Extract, bone marrow micronucleus, acute toxicity, sperm abnormality

(责任编辑 李沙沙 张志华 责任译审 王 晶)