

木芙蓉叶有效组分致突变与急性毒性实验研究*

Experimental Assessment on Mutagenicity and Acute Toxicity of the Effective Fraction of Leaves of *Hibiscus mutabilis* L.

符诗聪 张慧娟** 马景** 姚莉韵*** 张凤华 杜宁
Fu Shicong Zhang Huijuan Ma Jing Yao Liyun Zhang Fenghua Du Ning

(上海第二医科大学附属瑞金医院伤科 上海市瑞金二路 197号 200025)

(Department of Traumatology, Ruijin Hospital, Universitatis Medicinalis Secundae
Shanghai, 197 Ruijin Erlu, Shanghai, 200025, China)

摘要 为评价木芙蓉 (*Hibiscus mutabilis* L.) (MFR) 叶有效组分 (提取物) 的致基因突变和急性毒性作用, 根据《新药 (中药) 临床前研究指导原则汇编》的设计要求对 MFR叶有效组分进行致突变试验 (Ames 试验) 与急性毒性试验。Ames 试验在有和无代谢活化系统两平行条件下进行。对 20 只小鼠以生药 0.5 g/ml 浓度的 MFR 叶有效组分给小鼠灌胃, 灌胃量为 0.8 ml/20 g, 服药后, 以 LD₅₀ 判断急性毒性。Ames 试验最高剂量为 5 000 微克/皿, 最低剂量为 0.5 微克/皿; 无论 S9 存在与否, 均无致突变作用。小鼠灌胃 MFR 叶有效组分, 剂量相当于生药 312.4 g/kg, 为动物有效剂量的 150 倍, 未见毒性反应。表明, MFR 叶有效组分是低毒、安全的中药制剂, 可以进一步开发用于临床。

关键词 木芙蓉 (*Hibiscus mutabilis* L.) 叶 有效组分 基因突变性 急性毒性

中图法分类号 Q949.757.3; R965.3

Abstract To investigate the potential mutagenicity of the effective fraction (extract) of leaves of *Hibiscus mutabilis* L. (MFR), Ames test and acute toxicity test on MFR are conducted under the test design instruction of *Collection of Guidelines for Preclinical Investigation of Novel Medicine*. Ames test is carried out under two parallel conditions with and without metabolism activating system. Twenty mice are orally administrated with 0.5 g/ml of the effective fraction of MFR leaves, and the dosage for mouse is 0.8 ml/20 g weight. The toxicity is assessed by the mortality of mice in LD₅₀. In Ames test, the highest dosage is 5 000 μg/dish, while the lowest 0.5 μg/dish. No mutagenicity is observed with or without S9. The amount of effective fraction of MFR leaves given to mice is equal to 312.4 g/kg, which is the 150-fold the effective dosage. It is suggested that the effective fraction of MFR leaves is a safe Chinese herb preparation, and worth further developing for clinical application.

Key words *Hibiscus mutabilis* L., leave, effective fraction, gene mutagenicity, acute toxicity

木芙蓉 (*Hibiscus mutabilis* L.) (MFR), 又称拒

霜花, 为锦葵科木槿属植物, 以花、叶和根入药。文献记载该药外用和口服有很好的抗炎和消炎作用, 可以治疗阑尾炎、腮腺炎, 也可以治疗痛风性关节炎和丹毒、灼伤等疾病^[1]。《医宗金鉴·正骨心法要旨》中以木芙蓉叶为主药有芙蓉膏、定痛膏, 治疗外伤肿痛^[2]。现代药理实验证实, 木芙蓉叶可以消除巴豆油诱发的耳部水肿; 对大鼠角叉菜胶性足肿胀及小鼠腹腔毛细血管通透性均有明显的抑制作用, 并且是无毒

2001-11-12 收稿, 2001-12-11 修回

* 上海市教委资助重点课题 (98zd133)

** 上海市医药工业研究院毒理研究室, 200437 (Sector of Toxicology, Shanghai Institute of Medical Industry, Shanghai, 200437)

*** 上海第二医科大学化学教研室, 200025 (Dept. of Chemistry, Universitatis Medicinalis Secundae Shanghai, Shanghai, 200025)

的中药^[3]。上海第二医科大学瑞金医院伤科自 1997 年开始^[4,5],对 MFR 进行有效组分的提取和采用单盲法(做药效时,提取单位不提供有关的提取资料)进行药效学筛选,最终确定了 MFR 的有效组分。本研究旨在为开发具有我国自主知识产权中药抗炎新药安全性提供理论依据。

1 致突变试验 (Ames 试验)

参照文献 [6, 7] 的方法

1.1 材料与与方法

1.1.1 药品与试剂: 木芙蓉叶有效组分: 上海第二医科大学化学教研室提供 (批号: 000626); 浓度: 有效组分 (总黄酮) 7.3 mg/ml, 每 1 ml 相当于 1.07g 生药 菌株: 鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) TA97 TA98 TA100 和 TA102 四株试验菌, 美国加利福尼亚大学伯克利分校 Bruce. N. Ames 教授赠送, 保存于液氮中。9-氨基吡啶: 上海试剂总厂三分厂产品, (批号: 1708); 2-氨基苄: Aldrich 公司产品, (批号: 215473); 柔毛霉素: 意大利爱宝大药厂产品, (批号: 4013DA); 甲基磺酸甲酯: Merck 公司产品, (批号: 8250895); 1, 8-二羟蒽醌: 上海化学试剂公司进口分装, (批号: 98-04-15); 叠氮钠: 上海医药工业研究院药物合成研究室提供; 辅酶 II: 上海丽珠东风生物技术有限公司提供 (批号: 2007); G-6-P 中科院上海生化所东风生化技术公司, (批号: 5108); 注射用水: 上海信谊药厂产品: (批号: 000708); 无水乙醇: 上海振兴化工一厂, (批号: 9811305); 吐温-80 上海化学试剂公司: (批号: F 990622)

1.1.2 药液配制方法: 用注射用水将木芙蓉叶有效组分配制成 50 mg/ml, 再按 1: 10 稀释, 获得 5 个等比浓度溶液, 每个溶液各取 0.1 ml 药液, 分别置于 5 个平皿中, 终剂量分别为 5 000 500 50 5 和 0.5 微克/ml。

1.1.3 阳性对照: - S9 + S9
 TA97 9-氨基吡啶 2-氨基苄
 TA98 柔毛霉素 2-氨基苄
 TA100 叠氮钠 2-氨基苄
 TA102 甲基磺酸甲酯 1, 8-二羟蒽醌

1.1.4 阴性对照: - S9 + S9
 注射用水 含 S9 的混合液

1.2 菌株鉴定

1.2.1 组氨酸营养缺陷型: 只能在含有组氨酸的培养基上生长

1.2.2 脂多糖屏障缺失 (rfa): 用浸湿菌液的滤纸条

印影在全营养培养基上, 将浸湿结晶紫水溶液的纸条交叉放置其上, 经 37°C 培养 12~ 24 h 后, 在结晶紫滤纸条交叉处出现杀 (抑) 菌带。

1.2.3 紫外线修复缺失 (Δ uvrB): 用浸湿菌液的滤纸条印影在全营养培养基上, 用黑纸盖住平板的一半, 置 15 W 紫外灯下距离紫外灯 33 cm 处照射 (有 R 因子的菌株照射 8 s, 无 R 因子的菌株照射 6 s), 经 37°C 培养 12~ 24 h, Δ uvrB 经照射后不生长。

1.2.4 R 因子: TA97 TA98 和 TA100 带有 pKM101 质粒 TA102 带有 pKM101 质粒和 pAQ1 质粒。

1.2.5 pKM101 质粒的鉴定: 用浸湿菌液的滤纸条印影在全营养培养基上, 将浸湿氨苄青霉素溶液的滤纸条交叉放置其上, 经 37°C 培养 12~ 24 h 后, 带 pKM101 质粒的菌株在氨苄青霉素滤纸条交叉处无杀 (抑) 菌带。

1.2.6 pAQ1 质粒的鉴定: 用浸湿菌液的滤纸条印影在全营养培养基上, 将浸湿四环素溶液的滤纸条交叉放置其上, 经 37°C 培养 12~ 24 h 后, 带 pAQ1 质粒的菌株在四环素滤纸条交叉处无杀 (抑) 菌带。对已知诱变剂 (阳性对照) 呈阳性反应。

1.3 剂量

剂量设置依据: 按我国新药毒理学研究指导原则要求, 最高剂量应为 5 毫克/ml, 根据预试验结果, 最高剂量可达 5 毫克/ml, 以下再设 500 50 5 和 0.5 微克/ml, 共 5 个剂量级。

1.4 哺乳动物肝微粒体酶激活系统

肝微粒体酶系的诱导和制备: SD 雄性大鼠, 体重 180~ 200 g, 由腹腔注射 Aroclor1254 500 mg/kg (用玉米油按需稀释 Aroclor1254) 诱导后第 5 天断头放血, 在 4°C 无菌条件下解剖大鼠取出肝脏制成匀浆, 9 000 g 离心 10 min, 取其上清液

S9 混合液的配制: 每 10 ml 混合液含 S9 2 ml, 辅酶 II 29.7 mg, 葡萄糖-6-磷酸钠 15.2 mg, 加灭菌水至 10 ml

S9 活性检查: 对间接诱变剂 2-氨基苄有良好的激活能力。

S9 蛋白含量测定: 经 Lowry 法测得蛋白含量为 31.6 mg/ml

S9 经 37°C, 48 h 培养, 无菌试验合格

S9 分装后储存于液氮中备用。

1.5 试验方法

实验分为加和不加代谢激活系统 S9 两组平行试验。采用标准平皿掺入法。将盛有 2 ml 上层琼脂的试管于 48°C 水浴中保温, 待底层琼脂冷却凝固后, 每支

试管依次加入 0.1 ml 受试液 (自然回复即阴性对照组加 0.1 ml 注射用水), 0.3 ml S9 混合液 (+ S9 组) 或 0.3 ml 磷酸缓冲液 (- S9 组) 和 0.1 ml 菌液 (约 10^7)。摇匀, 倒入底层琼脂平皿上, 并铺平, 置 37°C 培养 48 h 取出后计数菌落, 每浓度做 3 个平皿。每株试验菌均有 1 组 (\pm S9) 已知诱变剂 (阳性对照), 以证明该菌株的突变特性。在计数菌落前用显微镜观察背景, 了解有无抑菌现象。各浓度组出现的菌落数与试验菌的自然回复菌落数比较, 不到 2 倍作为阴性, 2 倍以上为阳性。

2 急性毒性试验

参照文献 [8] 的方法。

2.1 药品与试剂

木芙蓉叶有效组分由上海第二医科大学化学教研室提供 (批号: 000626), 含量: 有效组分 (总黄酮) 7.3 mg/ml (1 mg 相当于生药 1.07 g); 性状: 棕色水溶液。赋性剂: 含 2.1% 土温 -80 的水溶液。

2.2 实验动物

昆明种小鼠, 体重 $20 \pm 2\text{g}$, 4-5 周龄; 雌雄各半, 各 20 只, 由上海市医药工业研究院实验动物房提供, 合格证号: 沪医药 (质) 字第 010 号。

2.3 剂量设置

2.3.1 分组: (1) 受试物组 有效组分 292.0 mg/kg 体重, 相当于生药 312.4 g/kg 体重 (2) 对照组 2.1% 土温 -80 的水溶液 0.8 ml

2.3.2 剂量设置依据: 木芙蓉叶有效组分临床拟用量生药 15 克/人 \cdot 天 $^{-1}$, 即 0.21 g/kg \cdot d $^{-1}$ (按 70 kg

表 1 木芙蓉叶有效组分 Ames 试验结果*

Table 1 Ames test of the effective fraction of leaves of *Hibiscus mutabilis* L.

组别 Group (微克/皿, $\mu\text{g}/\text{disk}$)	TA97		TA98		TA100		TA102	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
MFR5000	144.7 \pm 12.2	92.7 \pm 11.9	34.3 \pm 2.1	36.7 \pm 8.1	131.7 \pm 12.6	140.3 \pm 17.2	208.0 \pm 2.6	225.3 \pm 5.0
MFR500	145.3 \pm 6.4	138.3 \pm 14.4	24.0 \pm 1.7	21.3 \pm 1.51	145.3 \pm 8.3	184.7 \pm 13.6	236.7 \pm 30.5	242.3 \pm 23.6
MFR50	117.0 \pm 2.0	121.7 \pm 2.9	22.7 \pm 3.8	28.0 \pm 1.0	149.3 \pm 13.6	154.3 \pm 15.0	237.7 \pm 6.0	253.0 \pm 3.0
MFR5	120.0 \pm 8.2	123.3 \pm 5.5	22.3 \pm 3.5	30.7 \pm 1.5	135.0 \pm 13.2	157.7 \pm 20.3	222.0 \pm 8.5	222.0 \pm 18.4
MFR0.5	126.3 \pm 14.4	124.3 \pm 11.9	21.7 \pm 3.1	29.3 \pm 2.1	150.3 \pm 12.7	140.3 \pm 2.5	217.7 \pm 8.6	233.3 \pm 20.8
自然回复 Physio-reversion	107.3 \pm 7.2	137.3 \pm 12.9	23.0 \pm 3.0	28.0 \pm 6.1	131.3 \pm 11.1	161.3 \pm 11.4	221.0 \pm 16.5	253.0 \pm 3.0
叠氮钠 Sodium azide 2					900			
2-氨基苊 2-Amino fluorene 20		1 312		1 600		1 410		
甲基磺酸甲酯 Methyl mesylate 2							4 640	
1,8-二羟基蒽 1,8-altan								760
9-氨基吡啶 9-Acramidine 50	1 472							
柔毛霉素 Rubidazole			1 503					

* 以每浓度组 3 个平皿菌落数的平均值 ($\bar{x} \pm s$) 表示 * Average ($\bar{x} \pm s$) of colonies in three disks of each concentration.

计); 小鼠有效剂量生药 2.1 g/kg, 本试验剂量设置为动物有效剂量的 150 倍

2.3.3 给药容量: 每只小鼠给药容量为 0.8 ml/20 g 体重。

2.3.4 给药途径: 灌胃, 试验前禁食 6 h

2.3.5 观察指标: 观察期为 7 d 主要观察: 死亡情况, 尸检和病理组织形态学镜检毒性反应的一般表现

3 结果

3.1 致突变试验结果

木芙蓉叶有效组分 Ames 试验结果见表 1 表 1 表明, 各剂量组无论 S9 存在与否, 菌落数均未超过试验菌自然回复菌落数的 2 倍, 无剂量反应关系。阳性对照组均出现突变现象。按新药审批办法有关规定木芙蓉叶有效组分 Ames 试验结果为阴性。试验表明, 木芙蓉叶有效组分对 *S. typhimurium* TA97 TA98 TA100 和 TA102 无致突变作用。

3.2 急性毒性试验结果

受试物组、赋性剂对照组小鼠给药后活动正常, 未见异常反应。试验期间给药组动物饮食正常, 体重正常, 与对照组相比无显著性差异 (见表 2), 未发现与药物相关的异常现象。7 d 后, 采用脱颈椎法处死存活小鼠, 尸检各主要脏器均未见病变。试验表明, 小鼠单次灌胃给予木芙蓉叶有效组分, 相当于生药 312.4 g/kg, 为动物有效剂量的 150 倍, 未见毒性反应。

表 2 小鼠口服木芙蓉急性毒性试验中小鼠的体重变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 The weight change of the mice administrated orally with the effective fraction of leaves of *Hibiscus mutabilis* L. in the acute toxicity test ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

性别 Gender	时间 Time	对照组 Control (g)	给药组 Treatment (g)
雄 Male	给药前 Before treatment	17.66±0.44	17.88±0.75
	给药第 7 天 The 7th day after treatment	26.99±1.16	27.90±1.6f
雌 Female	给药前 Before treatment	17.98±0.95	17.91±0.70
	给药第 7 天 The 7th day after treatment	25.19±1.26	24.71±1.37

* 与阴性对照组相比 Compared with the control $P > 0.05$

4 讨论

Ames 试验是美国环保局确定的化学物质远期安全评价组合试验中首选的方法,用于检测药物是否会引起细胞的基因突变。文献报道,以细菌致突变试验方法检测化学物质的可靠性达 85%~95%^[9];而急性毒性试验则是观察动物对某一药物的耐受量,两者互补说明该药物的安全性,这是开发新药所必不可缺的内容之一。

本实验通过木芙蓉叶有效组分 5 个等比浓度的溶液与另外 6 种阳性致突变剂比较,各剂量组无论 S9 存在与否,对各菌株的自然回复菌落数均在正常范围(菌落数均未超过试验菌自然回复菌落数的 2 倍,无剂量反应关系),而阳性诱变剂自然回复菌落数明显超过 2 倍,阳性对照组均出现突变现象。按新药审批办法有关规定,芙蓉叶有效组分 Ames 试验结果为阴性,说明该有效组分是安全的并可以用于进一步开发的药物。

急性毒性试验可以用两种方法来实现,一种是半数致死量(LD₅₀);另一种是最大耐受量试验(即安全限度试验)后者在实验时较前者简便,因为最大耐受量试验方法简单而且可以达到同样的目的,加上又有长期临床应用经验,所以本实验采用后法。结果证明木芙蓉叶有效组分的最大耐受量可以达到人体的 150 倍,同样也说明木芙蓉叶有效组分是安全的可以开发的一种药物。

致谢

作者在完成本文时,曾得到上海第二医科大学瑞金医院伤科史炜镔博士及上海市伤骨科研究所陆葵助理研究员的帮助,在此表示衷心的感谢。

参考文献

- 1 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准(中药材). 第 1 册. 广州: 广东科学技术出版社, 1992. 16~17.
- 2 胡金曼. 木芙蓉的药用价值. 陕西中医杂志, 1990, 11(6): 276.
- 3 徐 娅, 郑幼兰, 林建峰等. 木芙蓉叶的抗炎作用及其毒性研究. 福建医药杂志, 1989, 11(3): 24~26.
- 4 张 昊, 杜 宁, 张凤华等. 木芙蓉叶提取物抗炎作用的实验研究. 上海第二医科大学学报, 1998, 18(增刊): 91~92.
- 5 符诗聪, 张凤华, 史炜镔等. 木芙蓉叶有效组分抗炎作用的实验研究初步报道. 上海第二医科大学学报, 2001, 21(1): 69~71.
- 6 李寿祺. 卫生毒理学基本原理和方法. 成都: 四川科学技术出版社, 1987. 416~427.
- 7 Maron DM. Revised method for the *Salmonella mutagenicity* test. *Muta Res*, 1983, 113~173.
- 8 中华人民共和国卫生部药政局. 新药(西药)临床前研究指导原则汇编(药理学、药理学、毒理学). 1993. 116~118.
- 9 刘淑英, 孙毓柏, 魏莲蓬等. Ames 试验检测不同工艺制作灵香草浸膏的致突变性. 卫生毒理学杂志, 1994, 8(1): 42~44.

(责任编辑: 蒋汉明)