

蛞蝓胶囊致畸和致突变实验研究

严鹏科¹, 李世煌², 段才闻³, 吴仲洪¹, 肖国宏¹, 谢金魁^{3*} (1. 广州医学院第三附属医院, 广州 510150; 2. 湖南郴州市第四人民医院心内科, 湖南 郴州 423000; 3. 南华大学药物药理研究所, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 目的 探讨蛞蝓胶囊是否具有致畸和致突变的毒理作用。方法 本研究采用大鼠致畸胎、艾姆斯(Ames)试验、小鼠骨髓细胞微核试验、体外细胞染色体畸变试验检测的蛞蝓胶囊致畸胎、致突变性。结果 蛞蝓胶囊各剂量对孕鼠体重、胚胎早期发育、胚胎生长发育、以及胎鼠的骨骼发育和内脏器官发育等均无不良影响。无论加与不加 S9, 各剂量组诱变 TA98、TA100 种菌落数均未超过自然回变菌落数, 与阴性对照组比较均无显著性差异($P>0.05$)。与对照组相比, 各剂量组对小鼠的微核率无明显的影晌($P>0.05$)。蛞蝓胶囊对培养的哺乳动物体细胞染色体结构无致畸变作用。结论 蛞蝓胶囊各剂量均无致畸和致突变的作用, 说明在临床应用剂量范围内是安全的。

关键词: 蛞蝓胶囊; 致畸胎; 致突变; 艾姆斯试验; 骨髓细胞微核试验

中图分类号: R994.231; R994.234 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2009)12-0975-04

Study of Slug Capsule on Teratogenicity and Mutagenicity

YAN Pengke¹, LI Shihuang², DUAN Caiwen³, WU Zhonghong¹, XIAO Guohong¹, XIE Jinkui*(1. The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510150, China; 2. Chenzhou Fourth People's Hospital, Chenzhou 423000, China; 3. Institute of Pharmacology and Pharmacy, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the toxicological effects of Slug capsule on teratogenicity and mutagenicity. **METHODS** Effects of Slug capsule on teratogenicity and mutagenicity were tested by teratogenesis in rats, Ames assay, Amblem nuclear test in bone marrow cells of mice and chromosome aberration (CA) analysis *in vitro*. **RESULTS** The development toxicity was not observed in the development of embryos after treatment of Slug capsule. Compared with the control group, Slug capsules have no significant effect on mutagenesis to TA98, TA100 with or without S9 ($P>0.05$). The rate of CA in mice induced by Slug capsules had no significant difference compared with the control group ($P>0.05$). Slug capsules had no effect on the cultural mammal somatic chromosome. **CONCLUSION** Slug capsules had no effects of teratogenicity and chromosome damage, and indicated its clinical application was to be safe.

KEY WORDS: Slug capsule; teratogenicity; mutagenicity; Ames assay; Amblem nuclear test

蛞蝓为腹足类腹足纲肺螺目蛞蝓科中有肺软体动物, 新鲜或干燥全体作药用。《神农本草经》、《本草纲目》、《中药大辞典》等古今中医药著作, 对其性味归经、功效主治等都有详细记载, 常用于治疗咳、喘、痰鸣、咽喉肿痛等症候。

蛞蝓胶囊为本研究组采用蛞蝓成虫经匀浆、冻干后制备的胶囊剂, 其功能主治为: 平喘止咳, 固肺祛邪, 主要用于慢性阻塞性肺病、慢性支气管炎、支气管哮喘等疾患的治疗, 症见, 胸部膨满, 涨闷如塞, 喘咳上气, 痰多, 烦躁, 心慌等。蛞蝓对肿瘤确有一定的抑制作用, 几乎与一些化疗药物相等, 且毒副作用较小^[1]。已有研究表明, 蛞蝓对肺部肿瘤具有一定的治疗作用。对人肺鳞癌、乳腺癌、原发性肝癌、直肠癌手术标本和肺腺癌胸膜侵犯胸水中的癌细胞的蛞蝓药效学研究

结果表明蛞蝓对肺鳞癌、肺腺癌细胞有显著抑制作用, 达到了药效敏感标准且优于对照药顺铂^[2]。用小鼠灌胃给药的急性毒性实验, 观察 14 d 表明, 蛞蝓混悬液 8.25 g·kg⁻¹ [相当于 4.5 g·(60kg)⁻¹·d⁻¹ 临床使用剂量的 110 倍]对小鼠无明显毒副作用。慢性毒性实验以相当于临床使用剂量的 30 倍连续给药 90 d, 观察动物的神态、饮食、体重, 于实验第 91 天解剖小鼠, 取出主要脏器作组织、病理学检查。结果表明除有肺泡壁增厚现象发生外, 其余均正常。这都说明蛞蝓是一个比较安全、无明显毒副作用的药物^[3]。但有关蛞蝓胶囊的致畸胎和致突变作用未见报道, 因此本试验对蛞蝓胶囊的大鼠致畸胎、小鼠骨髓细胞染色体损伤作用等进行探讨。

1 材料和试剂

作者简介: 严鹏科, 男, 博士, 副教授 Tel: (020)81292706
Tel: 13924260181 E-mail: xjk40919@sohu.com

E-mail: YanPK@tom.com *通信作者: 谢金魁, 男, 教授, 主任医师

实验动物, SD 大白鼠, 110 只, 雌性 80 只, 雄性 30 只, 体重 180~250 g。由湖南农业大学动物科技学院实验动物中心提供, 合格证号: scxk(湘): 2003-0003。昆明种小白鼠 50 只, ♂ ♀ 各半, 体重 18~22 g, 由南华大学动物中心提供, 合格证号: SCXK(湘)2004-0009。

蛞蝓胶囊(南华大学药物药理研究所); 实验菌株 TA98、TA100(天津市劳动卫生职业病研究所); 细胞株[中国仓鼠肺细胞(CHL)由北京生物制品检定所提供]; 敌克松(Dexon)、叠氮钠(NaN_3)、RPMI 640、还原型辅酶 II (Sigma 公司); 胎牛血清(天津灏洋生物制品科技有限公司)。

2 方法

2.1 大鼠致畸胎试验

按常规方法, 雌雄大鼠 2:1 同笼过夜, 次晨将查到阴栓的雌性大鼠定为孕 0 d。将受孕鼠随机分为 700, 2 100, 6 300 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 3 个组及阴性对照组(生理盐水), 每组 12 只, 每 5 d 称重 1 次。于孕 7~15 d 连续灌胃受试物, 于受孕第 19 天解剖取卵巢和胎仔进行测量和观察。

2.2 艾姆斯(Ames)试验

选取鼠伤寒沙门氏菌 TA98 和 TA100 种菌株进行自发回复突变试验。用雄性 SD 大鼠肝匀浆 S9 作为代谢活化物。每皿分别设 1 800, 3 600, 7 200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 受试药物进行标准平皿掺入试验。每个剂量设 3 个平行平皿, 并重复 1 次; 同时, 设阴性(生理盐水)对照组。

2.3 小鼠骨髓细胞微核试验

取昆明系小鼠 40 只(体重 18~22 g)随机分成 4

表 1 蛞蝓胶囊对黄体数等指标的影响($n=12, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effect of Slug capsule on number of corpus luteum and other indicators($n=12, \bar{x} \pm s$)

剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	黄体数	着床数	活胎数	死胎数	吸收胎数
700	12.33±1.15	11.50±1.00	11.25±0.97	0	5
2 100	13.25±0.97	12.33±0.98	11.92±1.00	0	8
6 300	13.42±0.90	12.83±1.27	12.67±1.30	0	2
生理盐水	13.08±1.38	12.42±1.51	12.25±1.36	0	5

表 2 蛞蝓胶囊对胎仔生长发育的影响($n=20, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effect of Slug capsule on fetal growth and development ($n=20, \bar{x} \pm s$)

剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	身长/mm	体重/g	门宽/mm
700	38.72±1.63	3.94±0.29	2.47±0.18
2 100	38.01±1.34	4.25±0.34	2.65±0.29
6 300	38.75±0.95	4.07±0.16	2.92±0.27
生理盐水	40.48±1.27	4.21±0.25	2.42±0.25

3.2 蛞蝓胶囊对 TA98、TA100 的致突变作用

蛞蝓胶囊高、中、低剂量组对 TA98、TA100

组, 每组 10 只, ♂ ♀ 各半, 即蛞蝓胶囊高、中和低剂量(7 200, 3 600, 1 800 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组和阴性(生理盐水)对照组。2 次 ig 给药, 间隔 24 h, 于末次 ig 给药后 6 h。断颈处死小鼠, 取股骨骨髓涂片染色, 进行微核检查。镜检每只鼠计数 10 000 个多染红细胞中出现微核的细胞数, 计算有微核多染红细胞率。

2.4 体外细胞染色体畸变试验

试验设蛞蝓胶囊高、中和低剂量(7 200, 3 600, 1 800 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组和阴性(生理盐水)对照组。实验前以 $10^5\cdot\text{mL}^{-1}$ 细胞接种, 直接法在加入受试药物后 24 h 和 48 h 收获细胞。间接法加受试物同时加 S9 混合液, 作用 6 h 后换液, 继续培养 24 h 收获细胞。在收获前 2 h 加秋水仙素, 计数分散良好的中期细胞, 记录染色体畸变类型。

2.5 数据处理

实验所得数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并采用单因素方差分析, 各组间通过 Newman-Keuls 法进行两两比较, 以 $P<0.05$ 为差异显著性。

3 结果

3.1 蛞蝓胶囊对胚胎发育的影响

蛞蝓胶囊高、中、低剂量组平均黄体数、胚胎着床数、活胎数、死胎数、吸收胎数等指标与阴性对照组比较均无显著性差异($P>0.05$), 结果见表 1。蛞蝓胶囊各组胎仔外观、骨骼、内脏大体解剖检查, 各剂量组与阴性对照组比较均无显著性差异($P>0.05$)。蛞蝓胶囊各组胎仔的身长、体重、门宽及与阴性对照组比较无显著性差异($P>0.05$), 结果见表 2。

的致突变作用与阴性对照组比较均无显著性差异($P>0.05$), 结果见表 3。

3.3 蛞蝓胶囊对小鼠骨髓细胞微核率的影响

蛞蝓胶囊高、中、低剂量组与阴性对照组比较均无显著性差异($P>0.05$), 结果见表 4。

3.4 蛞蝓胶囊对 CHL 染色体畸变的影响

蛞蝓胶囊高、中、低剂量组与阴性对照组比较均无显著性差异($P>0.05$), 结果见表 5。

表3 蛞蝓胶囊对TA98、TA100的致突变作用 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effect of Slug capsule on mutagenicity of TA98 or TA100($n=6, \bar{x} \pm s$)

剂量/mg·kg ⁻¹	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
1 800	32±3.6	37±4.1	105±20.1	113±19.7
3 600	33±2.9	34±3.8	116±18.6	109±24.5
7 200	36±3.1	40±3.2	120±22.5	124±20.8
生理盐水	35±3.3	33±3.5	129±19.4	118±27.6

表5 蛞蝓胶囊对CHL细胞染色体畸变的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 5 Effect of Slug capsule on chromosomal aberrations in CHL cells($\bar{x} \pm s$)

剂量/mg·kg ⁻¹	细胞数	-S9(24h)		-S9(48h)		+S9(24h)	
		畸变数	畸变类型	畸变数	畸变类型	畸变数	畸变类型
1 800	100	1	GF	1	G	2	BG
3 600	100	2	BG	0	BG	1	BG
7 200	100	5	BG	1	G	2	BG
生理盐水	100	1	B	0	-	0	-

注: G-裂隙; B-断裂; F-碎片或粉碎化; E-互换

Note: G-gap; B-breakdown; F-fragment; E-exchange

4 讨论

蛞蝓为有肺的软体动物, 属腹足类腹足纲蛞蝓科, 我国各地有产。近年研究表明蛞蝓对癌症具有一定的治疗作用, 谢金魁等^[4]发现0.6%蛞蝓浸出液可明显影响离体肺癌细胞的生长, 且对肺癌细胞A549的形态、结构有一定影响。对人肺鳞癌、乳腺癌、原发性肝癌、直肠癌手术标本和肺腺癌胸膜侵犯胸水中的癌细胞的蛞蝓药效学研究结果表明蛞蝓对肺鳞癌、肺腺癌细胞有显著抑制作用, 达到了药效敏感标准且优于对照药顺铂。柳娜等^[5]报道蛞蝓糖蛋白提出多糖抑制小鼠Lewis肺癌皮下移植瘤生长和自发性肺转移, 并诱导癌细胞凋亡。但对原发性肝癌、乳腺癌和直肠癌抑制不明显, 提示蛞蝓对肺鳞癌、肺腺癌的抑制具有特异性^[2]。体内实验研究表明, 蛞蝓混悬液灌胃给药对多种小鼠移植性实验肿瘤均有抑制作用^[6-7]。

另有文献报道, 蛞蝓对支气管炎和支气管哮喘等肺部疾病有治疗效果。蛞蝓加适量白糖捣成蛋清状可治疗支气管喘息^[8], 或者和适量象贝制成玉涎丹用于治疗多种喘息^[9]。金治民等^[10]用蛞蝓水提液肌注, 治疗慢性支气管炎和支气管哮喘, 总有效率达90.66%, 说明蛞蝓止咳平喘及消炎作用可靠。用鲜蛞蝓配伍葶苈子和松花贝母制成定

表4 蛞蝓胶囊对小鼠骨髓细胞微核率的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 4 Effect of Slug capsule on micronucleus test of bone marrow cells in mice ($n=10, \bar{x} \pm s$)

剂量/mg·kg ⁻¹	SCE 数	微核细胞数	微核率/%
1 800	10 000	24.9±2.02	2.49±0.20
3 600	10 000	27.9±1.97	2.79±0.20
7 200	10 000	20.2±2.10	2.02±0.21
生理盐水	10 000	24.8±1.87	2.48±0.19

喘丸治疗小儿支气管哮喘具有满意的疗效^[10]。最近刘群红等^[11]发现蛞蝓多糖在体外具有显著抑制乙肝病毒的作用, 表明蛞蝓在未来可能用于治疗乙肝。

笔者通过大鼠致畸胎试验、艾姆斯(Ames)试验、小鼠骨髓细胞微核试验、体外细胞染色体畸变试验观察蛞蝓胶囊的致畸胎和致突变性毒理作用。研究表明, 蛞蝓胶囊各剂量对孕鼠体重、胚胎早期发育、胚胎生长发育、以及胎鼠的骨骼发育和内脏器官发育等均无不良影响。无论加与不加 S9 各剂量组诱变 TA98TA100 种菌落数均未超过自然回变菌落数, 与阴性对照组比较均无显著性差异($P>0.05$)。与对照组相比, 各剂量组对小鼠的微核率无明显的影, ($P>0.05$)。在实验条件下, 蛞蝓胶囊不引起培养的哺乳动物体细胞染色体结构的畸变。

综上所述, 蛞蝓胶囊无明显的致畸和致突变毒理作用, 说明在临床应用剂量范围内是安全的。

REFERENCES

- [1] YIN Z, ZHUANG Y Z, CAO J G. An overview on the investigation of anti-tumor effect by limax [J]. China Pract Med(中国实用医药), 2009, 4(1): 226-227.
- [2] XIE J K, CAO J G. Study on inhibition of limax in squamous cell carcinoma of the lung and adenocarcinoma [J]. Cancer Res

- Prev Treat (肿瘤防治研究), 1997, 424(6): 344-346.
- [3] WANG Z, CHENG J, LIN L, et al. Medicinal value of limax [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2005, 28 (5): 368-370.
- [4] XIE J K. Effect of limax on lung cancer cell growth rate [J]. J Beijing Coll Tradit Chin Med (北京中医学院学报), 1989, 12(5): 43-44.
- [5] LIU N, YIN Z, ZHUANG Y Z, et al. Effects of LE-DZ on lung adenocarcinoma *in vitro* and *in vivo* [J]. Chin Clin Oncol (临床肿瘤学志), 2008, 13(9): 779-783.
- [6] GUO Y F, WU X P. Limax inhibits tumor growth in tumor-bearing mice [J]. J Integ Tradit West Med (中西医结合杂志), 1989, 9(11): 675-676.
- [7] GUO Y F, WU X P. The antitumor effect of limax on P388-bearing mice [J]. Tradit Chin Med Res (中医研究), 1990, 3(4): 18-19.
- [8] DENG M N. Animal drug of china (中国动物药)[M]. Changchun: Jilin People's Publishing, 1981: 34.
- [9] Jiangsu New Medical College. Dictionary of Traditional Chinese Medicine (Book II) (中药大辞典)[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1997: 2375.
- [10] JIN Y M. Slug dingchuan pills treatment of children with bronchial asthma [J]. Zhejiang J Tradit Chin Med (浙江中医杂志), 1997, (5): 211-213.
- [11] LIU Q H, CAI X, LI C P. Studies on anti-HBV effect *in vitro* of limax polysaccharide [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2009, 15(5): 58-60.

收稿日期: 2009-06-29