

· 论著 ·

## 雷公藤内酯醇的遗传毒性评价

田逸君, 郑怡文, 朱玉平, 张晓芳, 宗英, 陆国才 (第二军医大学卫生毒理学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** **目的** 观察雷公藤的主要有效成分之一雷公藤内酯醇的遗传毒性。**方法** 采用鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验(Ames 试验)、体外培养 CHO 细胞染色体畸变试验和小鼠骨髓微核试验检测雷公藤内酯醇的遗传毒性。**结果** Ames 试验提示在每皿  $1.6 \sim 1\,000 \mu\text{g}$  受试剂量下, 在加或不加 S9 代谢活化系统时, 受试物对组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 TA97、TA98、TA100、TA102 及 TA1535 所诱发的回复突变菌落数均与溶媒对照的突变菌落数相近。体外培养 CHO 细胞染色体畸变试验结果显示  $0.01$ 、 $0.02$  和  $0.04 \mu\text{g}/\text{ml}$  3 个剂量的受试物, 对加与不加 S9 代谢活化系统培养的 CHO 细胞的染色体畸变率无明显影响。小鼠骨髓微核试验设  $180$ 、 $360$ 、 $720 \mu\text{g}/\text{kg}$  3 个剂量, 在  $720 \mu\text{g}/\text{kg}$  剂量时, 雷公藤内酯醇有诱发骨髓嗜多染红细胞微核率增高的效应。**结论** 在本实验条件下, 雷公藤内酯醇对鼠伤寒沙门氏菌无致突变性, 对哺乳动物培养细胞染色体无致畸变作用,  $720 \mu\text{g}/\text{kg}$  剂量下对 ICR 小鼠有诱发骨髓嗜多染红细胞微核率增高的效应。提示雷公藤内酯醇对人体可能具有潜在的遗传毒性。

**[关键词]** 雷公藤内酯醇; 致突变试验; 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验; 染色体畸变试验; 微核试验

**[中图分类号]** R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2016)03-0215-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.03.006

## Genotoxicity evaluation of triptolide

TIAN Yijun, ZHENG Yiwen, ZHU Yuping, ZHANG Xiaofang, ZONG Ying, LU Guocai (Department of Hygiene and Toxicology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the genotoxicity of triptolide, an important active component of *Tripterygium wilfordii* Hook f. **Methods** Ames test, *in vitro* chromosomal aberration test of CHO cell and *in vivo* micronucleus assay were performed to investigate the genotoxicity of triptolide. **Results** The Ames test showed that triptolide did not increase mutagenicity for TA97, TA98, TA100, TA102 and TA1535 strains at the dosage of  $1.6 \sim 1\,000 \mu\text{g}$  per plate with and without metabolic activation system S9. Results of *in vitro* CHO cell chromosomal aberration test indicated that there was no statistical difference between the triptolide groups (doses of  $0.01$ ,  $0.02$  and  $0.04 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) and the solvent control group with and without metabolic activation system S9. However, triptolide significantly increased polychromatophilic erythrocyte micronucleus formation at the dosage of  $720 \mu\text{g}/\text{kg}$  in ICR mice. **Conclusion** Triptolide did not induce genetic toxicity based on the Ames test and chromosomal aberration test, but could increase micronucleus formation at the dosage of  $720 \mu\text{g}/\text{kg}$ . These results indicated that triptolide may have potential genotoxicity on human health.

**[Key words]** triptolide; mutagenicity test; Ames test; chromosomal aberration test; micronucleus assay

药用植物雷公藤主要用于治疗类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、银屑病、肾脏疾病等炎性和自身免疫性疾病。雷公藤内酯醇是从雷公藤中分离的一种二萜类化合物, 因其生物活性较高, 具有显著的抗炎、免疫调节、减轻器官移植排斥反应的作用, 在

研究领域得到广泛关注<sup>[1]</sup>。近年来对雷公藤内酯醇及其衍生物的药理作用的相关研究很多, 为提高临床用药的安全性, 验证其是否具有遗传毒性, 本实验采用鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验(Ames 试验)、体外培养 CHO 细胞染色体畸变试验和小鼠骨髓微核试验方法进行了检测, 为雷公藤内酯醇的临床合理使用提供科学依据。

### 1 材料与方 法

**1.1 受试物及溶媒对照** 受试物为雷公藤内酯醇注射液(白色澄明溶液。其中 Ames 试验使用批号 20131023, 含量:  $99.8\%$ , 规格:  $7 \text{ ml} : 7 \text{ mg}$ ; 染色体

**[基金项目]** 国家科技重大专项基金(2014ZX09J14106-06C, 13CXZ005, BWS14J023); 国家自然科学基金(81473291, 81402651); 上海市自然科学基金(13ZR144940)

**[作者简介]** 田逸君, 硕士研究生. Tel: (021)81871026; E-mail: yijun\_tian@163.com

**[通讯作者]** 陆国才, 博士, 教授, 博士生导师. 研究方向: 新药临床前安全性评价. E-mail: newdrug@smmu.edu.cn

畸变试验和微核试验使用批号 20130702, 含量: 94.1%, 规格: 5 ml : 1 mg); 溶媒对照为丙二醇注射液(无色澄明液体, 批号 20110702, 含量: 10%, 规格: 5 ml/支), 受试物和溶媒对照均由第二军医大学药学院提供。氯化钠注射液(无色澄明液体, 批号 12030402, 规格: 250 ml : 2.25 g, 江苏亚邦生缘药业有限公司)。

**1.2 阳性对照** Ames 试验中加 S9 代谢活化系统组(+S9): TA97、TA98 及 TA100 为 2-氨基芴(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), TA102 为 1, 8-二羟基蒽醌(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), TA1535 为环磷酰胺(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); 不加 S9 代谢活化系统组(-S9): TA97 和 TA98 为敌克松(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), TA100 和 TA102 为甲基磺酸甲酯(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), TA1535 为 4-硝基喹啉-N-氧化物(0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); 染色体畸变试验中加 S9 代谢活化系统组(+S9)为环磷酰胺(60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 不加 S9 代谢活化系统组(-S9)为丝裂霉素 C(0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); 微核试验中为环磷酰胺(40 mg/kg)。

**1.3 菌株及细胞** 组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌(*S.typhimurium*) 5 个菌株 TA97、TA98、TA100、TA102 和 TA1535, 由复旦大学公共卫生学院环境卫生教研室赠予, 贮存于液氮中。实验前进行菌株鉴定, 均符合规定标准。中国仓鼠卵巢细胞(CHO 细胞)由国家上海新药安全评价研究中心赠予。

**1.4 动物** 选用性成熟(7~8 周龄, 体重 19~21 g) ICR 小鼠共 60 只, 由上海市西普尔-必凯动物有限公司提供, 实验动物质量合格证号 2008001623765。自购入日起 3 d 内进行检疫、环境适应及饲养。在检疫开始和结束的当天称量并记录动物体质量。检疫期间每天对动物的外观、摄食和粪便等情况进行观察并记录。根据检疫及适应性饲养结束时的体质量, 按随机区组法将雌、雄动物分别分组, 共分为 6 组, 每组 10 只, 雌雄各半。

**1.5 试验方法** 按《药物遗传毒性研究技术指导原则》<sup>[2,3]</sup> 的设计要求, 分别应用鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验<sup>[4]</sup>、体外培养 CHO 细胞染色体畸变试验方法<sup>[5]</sup> 和小鼠骨髓微核试验<sup>[6]</sup> 检测雷公藤内酯醇的遗传毒性。

**1.5.1 Ames 试验** 受试物原液浓度为 1 mg/ml, 故剂量设计为每皿 1 000、200、40、8、1.6  $\mu\text{g}$  共 5 个剂量组。溶媒对照为丙二醇注射液。受试物组和溶媒对照组每皿加入受试物或溶媒对照溶液 1 ml, 阳性对照组每皿加入阳性对照溶液 0.1 ml, 其中环磷酰胺临用前用氯化钠注射液配制, 其余阳性对照均

用二甲基亚砜(DMSO)配制。每个剂量组及对照组均设 3 个平行皿。受试物每个剂量组及对照组重复实验一次。

**1.5.2 体外培养 CHO 细胞染色体畸变试验** 根据预试验测定 50% 细胞生长抑制浓度  $\text{IC}_{50}$  为 0.04  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 故正式试验设低、中、高 3 个剂量组依次为 0.01、0.02 和 0.04  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 另设阳性对照组和溶媒对照组(丙二醇注射液)。短时处理组(-S9/4 h 组和 +S9/4 h 组); 细胞与受试物接触 4 h 后倾倒所有含有受试物的培养液, 洗涤后再加入 10 ml 1640 培养基, 继续培养至 24 h, 收集细胞; 长时处理组(-S9/24 h 组); 细胞与受试物接触 24 h 后收集细胞。用秋水仙碱处理, 使细胞的有丝分裂停止在中期相, 经低渗、固定、涂片和染色后, 在显微镜下观察染色体数量和结构的改变。

**1.5.3 小鼠骨髓微核试验** 采用小鼠经尾静脉注射给药, 该受试物急性毒性试验预试结果提示半数致死量  $\text{LD}_{50}$  为 1 438.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。综合考虑, 本试验设 3 个剂量组, 低、中、高剂量组分别为 180、360、720  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (临用时用氯化钠注射液稀释, 浓度依次为 18、36 和 72  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); 同时设立溶媒对照组(将 3.83 ml 丙二醇注射液用氯化钠注射液稀释至 10 ml, 此即为溶媒对照)和阳性对照组(环磷酰胺临用时用氯化钠注射液配制成 4.0 mg/ml 的溶液)。受试物根据拟用的临床给药途径采用单次经静脉注射的方式, 给药量为 10 ml/kg; 溶媒对照组给药方式与受试物组相同; 阳性对照组采用单次腹腔注射, 给药量为 10 ml/kg。

**1.6 判定标准** Ames 试验结果的评价是以比较受试物各剂量组与溶媒对照组的回复突变菌落数为基础, 若某剂量组回复突变菌落数为溶媒对照组突变菌落数的 2 倍以上, 呈现可重复性, 并在一定的剂量范围内存在着剂量反应关系, 则判断为阳性; 细胞染色体畸变试验和小鼠骨髓微核试验均采用  $\chi^2$  检验与溶媒对照组进行比较, 检验标准以  $P < 0.05$  为有统计学差异。

## 2 结果

**2.1 Ames 试验** 受试物各剂量组和对照组的平皿均未见污染, 并且可见背景菌苔生长。5 个菌株的自发回复突变菌落数以及阳性对照诱发的回复突变菌落数均在本实验室 Ames 试验历史对照范围内, 并且各菌株阳性对照组的回复突变菌落数与空白对照组相比显著增加, 提示本试验系统符合实验要求。在最高剂量已达到 1 000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的受试条件

下,未观察到受试物的抑菌现象。每皿1 000、200、40、8、1.6  $\mu\text{g}$  5个剂量组受试物在加或不加代谢活化系统(S9)时对TA97、TA98、TA100、TA102及TA1535所诱发的回复突变菌落数均与自发的突变菌落数相近,并且未观察到明显的剂量反应关系。结果见表1。

**2.2 体外培养CHO细胞染色体畸变试验** 染色体分析结果显示在-S9/24 h及+S9/4 h处理组,溶媒对照组的染色体畸变率分别小于5%;阳性对照组的染色体畸变率大于10%,验证了该系统的有效性。终浓度为0.01、0.02、0.04  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的受试物各剂量组细胞染色体畸变率均小于5%。结果见表2。

表1 雷公藤内酯醇的2次Ames试验结果(个/皿,  $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别 ( $\mu\text{g}/\text{皿}$ )	TA97		TA98		TA100		TA102		TA1535	
	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9
空白对照组	47 $\pm$ 13	44 $\pm$ 16	24 $\pm$ 3	22 $\pm$ 4	111 $\pm$ 26	105 $\pm$ 17	228 $\pm$ 29	215 $\pm$ 24	24 $\pm$ 4	23 $\pm$ 3
溶媒对照组	58 $\pm$ 4	55 $\pm$ 5	25 $\pm$ 4	18 $\pm$ 2	105 $\pm$ 35	100 $\pm$ 28	182 $\pm$ 45	213 $\pm$ 41	22 $\pm$ 4	18 $\pm$ 3
阳性对照组	835 $\pm$ 80	859 $\pm$ 58	984 $\pm$ 87	823 $\pm$ 17	963 $\pm$ 46	914 $\pm$ 86	980 $\pm$ 24	920 $\pm$ 48	385 $\pm$ 46	304 $\pm$ 39
1.6	60 $\pm$ 11	49 $\pm$ 4	17 $\pm$ 3	19 $\pm$ 3	99 $\pm$ 23	103 $\pm$ 36	214 $\pm$ 54	187 $\pm$ 23	17 $\pm$ 6	17 $\pm$ 4
8	68 $\pm$ 15	54 $\pm$ 8	16 $\pm$ 2	19 $\pm$ 4	104 $\pm$ 32	107 $\pm$ 37	214 $\pm$ 27	203 $\pm$ 14	16 $\pm$ 5	16 $\pm$ 3
40	65 $\pm$ 22	58 $\pm$ 10	19 $\pm$ 2	17 $\pm$ 2	110 $\pm$ 25	100 $\pm$ 21	228 $\pm$ 27	211 $\pm$ 29	17 $\pm$ 4	17 $\pm$ 3
200	60 $\pm$ 15	57 $\pm$ 14	16 $\pm$ 2	20 $\pm$ 5	111 $\pm$ 26	89 $\pm$ 10	201 $\pm$ 22	205 $\pm$ 49	19 $\pm$ 7	18 $\pm$ 2
1 000	60 $\pm$ 12	57 $\pm$ 10	17 $\pm$ 4	21 $\pm$ 3	123 $\pm$ 18	112 $\pm$ 26	231 $\pm$ 26	210 $\pm$ 49	16 $\pm$ 6	16 $\pm$ 3

表2 雷公藤内酯醇对体外培养CHO细胞的染色体畸变试验结果

组别 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	观察细胞数 (个)	各类染色体畸变数(个)								畸变细胞数 (个)	畸变率 (%)	
		断裂	断片	双着丝粒	三辐体	四辐体	碎片或微小体	环状	多倍体			
-S9/24 h												
溶媒对照组	200	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1.0
阳性对照组	100	15	1	0	0	0	0	0	0	0	14	14.0*
0.01	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.02	200	2	0	2	0	0	0	0	0	0	4	2.0
0.04	200	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.5
-S9/4 h												
0.01	200	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.5
0.02	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.04	200	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1.0
+S9/4 h												
溶媒对照组	200	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.5
阳性对照组	100	19	0	0	0	0	0	0	0	0	16	16.0*
0.01	200	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1.5
0.02	200	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1.0
0.04	200	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.5

\*  $P < 0.05$ ,与溶媒对照组比较

**2.3 小鼠骨髓微核试验** 在各受试剂量下观察对小鼠骨髓的抑制作用,阳性对照组雌性和雄性小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率与溶媒对照组相比差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),验证了本系统的有效性。180、360  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量受试物24 h采样组雌、雄小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率与溶媒对照组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ );720  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量24 h采样组和48 h采样组雌、雄小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率与溶媒对照组相比具有统计学意义( $P < 0.05$ )。结

果见表3。

### 3 讨论

近年来,雷公藤在我国临床上的应用日趋广泛,但其临床不良反应发生率较高,并呈剂量相关,在较高剂量时具有很强的毒性<sup>[7-11]</sup>。有文献报道,临床上雷公藤制剂引起的最为常见的不良反应为骨髓及血液系统损害,这可能是由于雷公藤中的有效成分影响了细胞内DNA的合成和复制,从而抑制了细

表 3 雷公藤内酯醇对小鼠骨髓嗜多染红细胞的微核效应

组别 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	性 别	动物 数 (只)	观察 PCE 数(个)	PCE/NCE ( $\bar{x}\pm s$ )	微核率 ( $\bar{x}\pm s, \%$ )
溶媒对照组	雌	5	9 486	1.39 $\pm$ 0.15	1.89 $\pm$ 0.82
阳性对照组	雌	5	9 995	1.44 $\pm$ 0.11	16.23 $\pm$ 3.08*
180(24 h 采样)	雌	5	9 365	1.26 $\pm$ 0.08	2.15 $\pm$ 1.46
360(24 h 采样)	雌	5	10 038	1.37 $\pm$ 0.10	2.79 $\pm$ 0.79
720(24 h 采样)	雌	5	9 727	1.33 $\pm$ 0.21	4.42 $\pm$ 1.30*
720(48 h 采样)	雌	5	9 841	1.41 $\pm$ 0.08	3.80 $\pm$ 1.34*
溶媒对照组	雄	5	9 709	1.29 $\pm$ 0.14	1.95 $\pm$ 0.73
阳性对照组	雄	5	9 895	1.44 $\pm$ 0.12	17.30 $\pm$ 3.36*
180(24 h 采样)	雄	5	9 264	1.45 $\pm$ 0.24	2.78 $\pm$ 1.63
360(24 h 采样)	雄	5	10 038	1.34 $\pm$ 0.09	2.89 $\pm$ 0.99
720(24 h 采样)	雄	5	9 726	1.30 $\pm$ 0.14	4.95 $\pm$ 1.32*
720(48 h 采样)	雄	5	9 682	1.19 $\pm$ 0.08	3.65 $\pm$ 1.51*

\*  $P < 0.05$ , 与溶媒对照组比较胞增殖<sup>[12-14]</sup>。

雷公藤内酯醇是雷公藤中的主要有效成分之一,通过自身独特的化学结构与其靶蛋白结合,发挥强大的抗炎、抗肿瘤、免疫抑制及抗生育等生物活性<sup>[15]</sup>。本研究分别从体外到体内,从细菌、离体细胞和整体动物水平上系统评价了雷公藤内酯醇的遗传毒性,结果表明雷公藤内酯醇对鼠伤寒沙门氏菌无致突变性,对哺乳动物培养细胞染色体无致畸变作用。但小鼠微核试验结果表明,在 720  $\mu\text{g}/\text{kg}$  剂量下有诱发骨髓嗜多染红细胞微核率增高的效应,提示雷公藤内酯醇对人体可能具有潜在的遗传毒性。雷公藤及雷公藤内酯醇作为治疗药物在临床使用时应注意用药剂量及时间,以避免药物可能存在的对生殖、免疫、血液系统等的影<sup>[16-18]</sup>。

## 【参考文献】

- [1] 张晓慧,杨恩才,万春平.雷公藤内酯醇及其衍生物的药理作用研究进展[J].云南中医中药杂志,2013,34(8):64-65.
- [2] 国家食品药品监督管理总局.药物遗传毒性研究技术指导原则[EB/OL].2007-10-23 [2015-11-15].<http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1616/90936.html>.
- [3] 周海钧.ICH 药品注册的国际技术要求,安全性部分[M].北京:人民卫生出版社,2001:37-61.
- [4] OECD. Test Guidance 471; Bacterial Reverse Mutation Test [S]//OECD Guidance For Testing of Chemicals. Paris: Organization for Economic Cooperation & Development, 1997: 1-8.
- [5] OECD. Test Guidance 473; In Vitro Mammalian Chromo-

some Aberration Test [S]// OECD Guidance for Testing of Chemicals. Paris: Organization for Economic Cooperation & Development, 1997: 1-7.

- [6] OECD. Test Guidance 474; Mammalian Erythrocyte Micro-nucleus Test [S]//OECD Guidance for Testing of Chemicals. Paris: Organization for Economic Cooperation & Development, 1997: 1-7.
- [7] 张鹏宇,张瑞,王雅贤.雷公藤内酯醇抗肿瘤分子机制研究进展[J].中医学报,2009,37(3):79-82.
- [8] Ling D, Xia H, Park W, et al. pH-sensitive nanoformulated triptolide as a targeted therapeutic strategy for hepatocellular carcinoma[J]. ACS Nano, 2014, 8(8): 8027-8039.
- [9] 吴娜,刘星雨,王笃军,等.雷公藤内酯醇对 C57BL/6 小鼠亚慢性毒性作用的研究[J].中成药,2014,36(5):904-908.
- [10] 周顺长,吴越,王兵,等.雷公藤内酯醇聚合物胶束的急性毒性研究[J].医药导报,2013,32(12): 1563-1565.
- [11] Qu L, Qu F, Jia Z, et al. Integrated targeted sphingolipid-omics and transcriptomics reveal abnormal sphingolipid metabolism as a novel mechanism of the hepatotoxicity and nephrotoxicity of triptolide [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 170:28-38.
- [12] 骆永伟,施畅,原野,等.雷公藤甲素的毒理学研究进展[J].毒理学杂志,2009,23(1):74-77.
- [13] Zhang J, Liu L, Mu X, et al. Effect of triptolide on estradiol release from cultured rat granulosa cells [J]. Endocr J, 2012, 59(6): 473-481.
- [14] Jin J, Sun XZ, Zhao ZX, et al. Activation of the farnesoid X receptor attenuates triptolide-induced liver toxicity [J]. Phytomedicine, 2015, 22(10): 894-901.
- [15] 高涛.雷公藤内酯醇靶蛋白及其药理机制研究进展[J].重庆医学,2012,41(35):3777-3780.
- [16] Ho LJ, Chang WL, Chen A, et al. Differential immunomodulatory effects by Tripterygium wilfordii Hook f-derived refined extract PG27 and its purified component PG490 (triptolide) in human peripheral blood T cells: potential therapeutics for arthritis and possible mechanisms explaining in part Chinese herbal theory "Junn-Chenn-Zuou-SS" [J]. J Transl Med, 2013, 11:294.
- [17] Ma B, Qi HH, Li J, et al. Triptolide disrupts fatty acids and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) levels in male mice testes followed by testicular injury: A GC-MS based metabolomics study [J]. Toxicology, 2015, 336:84-95.
- [18] 杨建一,高宝珍,李莉,等.雷公藤多甙对雄性小鼠生殖细胞毒性的研究[J].癌变·畸变·突变,2008,20(5):393-397.

[收稿日期] 2015-11-15 [修回日期] 2016-01-14

[本文编辑] 顾文华