

研究简报

杞芪灵芝多糖的毒性

张 慧^{1,2}, 郑克岩³, 李胜超¹, 张 洁^{1,4}, 费晓方¹

(1. 吉林大学生命科学学院, 长春 130012; 2. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600;
3. 吉林大学化学学院, 长春 130012; 4. 长春中医药大学药学院, 长春 130177)

摘要: 采用霍恩氏法研究杞芪灵芝多糖的急性毒性, 采用骨髓细胞微核实验、小鼠精子畸形实验和 Ames 实验研究杞芪灵芝多糖的遗传毒性. 实验结果表明: 杞芪灵芝多糖经灌胃给药, 其半数致死量为 $LD_{50} > 21\ 500\ \text{mg/kg}$, 基本无毒; 在骨髓细胞微核实验中, 微核出现率与阴性对照组相比, 无显著性差异; 精子畸形实验中, 精子畸形率也无显著性差异; Ames 实验中的各浓度下, 无论是否加入 S9, 回变菌落数均未大于自发回变数的 2 倍. 表明杞芪灵芝多糖无急性致毒性和遗传致毒性.

关键词: 多糖; 遗传毒性; Ames 实验; 微核实验; 安全性

中图分类号: R994.4 文献标志码: A 文章编号: 1671-5489(2011)04-0792-04

Toxicity of Polysaccharides from Qiqi Lingzhi Physic Liquor

ZHANG Hui^{1,2}, ZHENG Ke-yan³, LI Sheng-chao¹, ZHANG Jie^{1,4}, FEI Xiao-fang¹

(1. College of Life Science, Jilin University, Changchun 130012, China; 2. Department of Drug,
Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, Liaoning Province, China;

3. College of Chemistry, Jilin University, Changchun 130012, China;

4. College of Pharmaceutics, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

Abstract: The genotoxic of polysaccharides from Qiqi Lingzhi physic liquor was studied by mice bone marrow cell micronuclei test, mice testicular chromosome aberration test and Ames test. Acute toxicity test used the method of Huo Enshi. The acute toxicity test of Qiqi Lingzhi polysaccharides showed that the $LD_{50} > 21\ 500\ \text{mg/kg}$. Little cytotoxicity was found in the bone marrow cell micronucleus test. No conspicuous teratogenic effect was observed in the test of teratospermia of mice. In the quaque concentration of Ames test, there was no mutagenesis. These results suggest that Qiqi Lingzhi polysaccharides have little toxicity and genotoxic that can be safely used in the long-term.

Key words: polysaccharides; genotoxic; Ames test; micronucleus test; safety

杞芪灵芝多糖是松杉灵芝中的主要成分. 松杉灵芝 (*Ganoderma tsugae*) 是吉林省长白山特产的一种灵芝^[1-3], 具有滋补强壮、扶正固本、延年益寿等功效. 文献[4-7]从松杉灵芝中分离、纯化了多种多糖成分, 并发现它们具有显著抗突变、抗肿瘤活性及具有激活人外周血细胞产生大量肿瘤坏死因子 $TNF\alpha$, IL-1 和 IL-6 的功能. 本文研究杞芪灵芝多糖的急性毒性和遗传毒性, 为进一步了解杞芪灵芝多糖的药理活性及开发利用提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 材 料 1) 杞芪灵芝口服液: 由长春市恒泰生物技术有限公司提供, 瓶装褐色液体, 含多糖

收稿日期: 2010-09-10.

作者简介: 张 慧(1971—), 女, 汉族, 博士, 副教授, 从事药学的研究, E-mail: syyycs@163.com. 通讯作者: 费晓方(1971—), 女, 汉族, 博士, 教授, 从事分子与细胞药理学研究, E-mail: feixf@jlu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30870552).

20.2 mg/瓶.

2) 杞芪灵芝多糖:将杞芪灵芝口服液4倍浓缩,制成相对体积质量为1.034的样品.以蒸馏水配成21.5,10.0,4.46,2.15 g/kg 4个剂量组样品备用.

3) ICR小白鼠、大鼠:由吉林大学基础医学院动物实验中心提供,动物合格证号:SCXK-(吉)2003-0001.

1.2 急性毒性实验 取18.5~22.0 g ICR小白鼠雌雄各20只,采用霍恩氏法,受试物一次性灌胃给药,各剂量组灌胃量均为0.02 mL/g.实验动物禁食不禁水16 h,记录动物的一般状态、体质量变化、中毒症状和死亡情况等.连续观察14 d.

1.3 遗传毒性实验

1.3.1 骨髓细胞微核实验 取25.8~30.0 g雌雄小鼠各25只,随机分为5组,阴性对照组(蒸馏水),受试样品设为10.0,5.0,2.5 g/kg;阳性对照(环磷酰胺,40 mg/kg)组,每组雌雄各5只.各实验组间隔24 h经口灌胃给药,各组每次灌胃给药量为0.02 mL/g,第二次灌胃后6 h取股骨制片镜检.

1.3.2 小鼠精子畸形实验 取26.8~32.5 g雄性小鼠40只,灌胃给药.随机分为5组,阴性对照组(蒸馏水),受试样品设为10.0,5.0,2.5 g/kg;阳性对照(环磷酰胺,40 mg/kg)组,每组8只.各组每次灌胃给药量为0.02 mL/g,连续5 d,末次灌胃后第30天取附睾制片观察.

1.3.3 Ames实验 将多糖样品制成浓度为313,625,1 250,2 500,5 000 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 的溶液,经0.103 MPa,20 min灭菌后,分别在顶层琼脂中加入0.1 mL实验菌株增菌液、0.1 mL多糖样品溶液和0.5 mL S9混合液(代谢活化混合液),混合后倒入底层培养基平板上.同时做未处理对照、溶剂对照和阳性对照(TA97[-S9],TA98[-S9],TA102[-S9]:50.0 g/皿敌克松;TA100[-S9]:1.5 g/皿;TA97[+S9],TA98[+S9],TA100[+S9]:10.0 g/皿二氨基苄;TA102[+S9]:50.0 g/皿1,8-二羟基蒽醌).

2 结果

2.1 急性毒性实验结果 灌胃给予杞芪灵芝多糖后,14 d内小鼠无死亡.计算多糖对两种性别小鼠的急性毒性半数致死量,LD₅₀>21 500 mg/kg.根据急性毒性半数致死量分级标准,该多糖属于无毒级.实验结果列于表1.

表1 小鼠急性毒性实验结果

Table 1 Results of acute toxicity test in mice

剂量组/(g·kg ⁻¹)	性别	小鼠/只	始质量/g	终质量/g	动物死亡数/只	死亡率/%
21.5	雄性	5	20.1±0.5	31.3±1.4	0	0
10.0	雄性	5	20.0±0.8	30.4±1.0	0	0
4.64	雄性	5	20.1±0.9	31.1±1.7	0	0
2.15	雄性	5	19.7±0.8	30.2±1.6	0	0
21.5	雌性	5	19.4±0.6	31.2±2.3	0	0
10.0	雌性	5	19.6±0.7	31.0±1.5	0	0
4.64	雌性	5	19.5±0.7	31.7±2.0	0	0
2.15	雌性	5	19.4±0.9	30.2±1.5	0	0

2.2 遗传毒性实验结果

2.2.1 骨髓细胞微核实验结果 实验组动物在各实验剂量下,嗜多染红细胞(PCE)微核出现率、PCE/成熟红细胞(RBC)与阴性对照组相比,均无显著性差异($p>0.05$),而阳性对照环磷酰胺组与阴性对照组相比,有显著性差异($p<0.01$),显示强烈的致突变作用.结果显示杞芪灵芝多糖未见细胞毒性作用,实验结果列于表2.

2.2.2 小鼠精子畸形实验结果 阴性对照组的精子畸形率为23.2%,阳性对照组(环磷酰胺组)的精子畸形率为80.6%,二者相比有显著性差异($p<0.01$).而杞芪灵芝多糖3个剂量组的精子畸形率分别为20.4%,19.8%,21.6%,与阴性对照组相比无显著性差异($p>0.05$),表明该多糖对小鼠精子无遗传毒性,实验结果列于表3.

表2 小鼠骨髓细胞微核实验结果

Table 2 Results of bone marrow cell micronucleus test in mice

性别	剂量组/(g·kg ⁻¹)	小鼠/只	检查PCE数/个	PCE/RBC	含微核PCE数/个	微核率/‰
雄性	10.0	5	5×1 000	0.90±0.11	7	1.4
雄性	5.0	5	5×1 000	0.94±0.11	8	1.6
雄性	2.5	5	5×1 000	0.95±0.12	6	1.2
雄性	阴性对照组	5	5×1 000	0.91±0.11	6	1.2
雄性	阳性对照组	5	5×1 000	0.89±0.07	123*	24.6*
雌性	10.0	5	5×1 000	0.94±0.10	5	1.0
雌性	5.0	5	5×1 000	0.90±0.09	7	1.4
雌性	2.5	5	5×1 000	0.95±0.11	8	1.6
雌性	阴性对照组	5	5×1 000	0.93±0.10	9	1.8
雌性	阳性对照组	5	5×1 000	0.91±0.10	116*	23.2*

* $p < 0.01$ 和未处理对照组比较, 其余各组与未处理对照组比较均无显著性差异, $p > 0.05$.

表3 小鼠精子畸形实验结果*

Table 3 Results of test of teratospermia in mice

剂量组/(g·kg ⁻¹)	小鼠/只	观察精子数/个	畸形精子数/个	畸形率/‰	精子畸形类型/个							
					无定形	无钩	胖头	香蕉型	双头	双尾	尾折叠	其他
10.0	5	5×1 000	102	20.4	31	9	20	21	1	0	0	0
5.0	5	5×1 000	99	19.8	27	25	21	24	0	2	0	0
2.5	5	5×1 000	108	21.6	33	30	24	20	1	0	0	0
阴性	5	5×1 000	116	23.2	31	33	21	29	2	0	0	0
阳性	5	5×1 000	403 ^a	80.6 ^a	97	83	79	99	11	13	9	12

* $n = 3$; a. $p < 0.01$ 和阴性对照组比较; 其余各组与未处理对照组比较均无显著性差异 $p > 0.05$.

2.2.3 Ames 实验结果 在本实验中, 无论是否加入 S9 混合液, 回变菌落数均未大于自发回变数的 2 倍, 并且无剂量-反应关系. 而各阳性对照环磷酸胺组显示出强烈的诱变作用. 根据 Ames 实验结果判定标准, 表明杞芪灵芝多糖无致突变作用, 实验结果列于表 4.

表4 Ames 实验结果*

Table 4 Results of the test of Ames

剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TA97 - S9	TA97 + S9	TA98 - S9	TA98 + S9
5 000	143.0 ± 9.6	136.7 ± 9.0	38.0 ± 1.7	37.0 ± 3.6
2 500	140.0 ± 15.5	164.7 ± 11.8	39.0 ± 2.0	34.8 ± 3.2
1 250	136.3 ± 20.6	129.8 ± 32.2	39.6 ± 2.2	43.2 ± 4.3
625	141.0 ± 19.1	152.6 ± 17.8	38.7 ± 2.5	38.3 ± 2.1
313	131.0 ± 32.0	156.2 ± 24.0	36.0 ± 3.0	41.0 ± 4.0
未处理对照	154.3 ± 23.3	150.6 ± 24.5	38.3 ± 2.5	41.0 ± 4.0
溶剂对照	133.0 ± 23.3	142.0 ± 19.1	37.7 ± 3.1	40.7 ± 3.5
阳性对照	1 166.0 ± 220.7 ^a	988.0 ± 148.7 ^a	1 289.0 ± 83.2 ^a	886.7 ± 93.1 ^a
剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TA100 - S9	TA100 + S9	TA102 - S9	TA102 + S9
5 000	161.3 ± 8.1	153.8 ± 11.6	279.0 ± 3.0	267.0 ± 17.5
2 500	157.7 ± 16.9	172.6 ± 17.6	289.8 ± 31.5	287.3 ± 21.2
1 250	168.0 ± 15.6	160.6 ± 2.9	263.0 ± 24.2	274.4 ± 21.2
625	175.0 ± 15.4	164.0 ± 27.8	274.7 ± 7.6	260.5 ± 20.7
313	158.5 ± 19.1	158.7 ± 28.3	272.3 ± 13.1	292.3 ± 16.5
未处理对照	154.7 ± 14.3	151.0 ± 10.4	272.3 ± 13.1	279.7 ± 9.0
溶剂对照	164.0 ± 13.2	165.0 ± 23.3	271.7 ± 3.8	284.7 ± 21.8
阳性对照	942.0 ± 83.9 ^a	963.3 ± 98.7 ^a	1 054.0 ± 89.0 ^a	904.7 ± 54.9 ^a

* $n = 3$; a. $p < 0.01$ 和未处理对照组比较, 其余各组与未处理对照组比较均无显著性差异, $p > 0.05$.

3 讨 论

微核是指细胞中细胞核以外的颗粒,能与细胞核染色一致,一般相当于细胞直径的 $1/20 \sim 1/5$,呈圆形或杏仁状。微核主要是细胞有丝分裂受到干扰,致使细胞内染色体断裂或纺锤丝形成受阻,而滞留在胞核外的遗传物质。其频率可反映细胞DNA的受损程度^[8]。微核实验能检测各种物质因素诱导产生的染色体完整性改变及染色体分离改变这两种遗传学终点。精子的畸形主要是指形态的异常,是决定精子形成基因发生突变的结果。许多常染色体及X,Y性染色体基因直接或间接决定精子的形态,通过小鼠精子畸形实验可检测药物对精子生成、发育的影响^[9]。Ames是借助化学物质的致突变作用,即损伤遗传物质DNA的能力鉴定化学致癌物和致突变物的方法。致突变物可使测试菌株回复突变为野生型的能力得到提高,高于阴性对照,并伴有剂量-效应关系^[10]。本文采用上述3种方法,从诱导遗传物质DNA突变的不同角度,对杞芪灵芝多糖的遗传毒性进行了研究。通过人和小鼠量效换算^[11]表明,杞芪灵芝多糖实验用样品的最小浓度相当于正常人(60 kg)使用量的3 193倍,仍然无任何遗传毒性。同时,急毒结果显示,半数致死药量大于21 500 mg/kg。综上所述,杞芪灵芝多糖的毒性极低,作为保健品的原料非常安全。

参 考 文 献

- [1] ZHANG Jing-song, TANG Qing-jiu, Zimmerman-Kordmann M, et al. Activation of Blymphocytes by GLIS, a Bioactive Proteoglycan from *Ganoderma lucidum* [J]. Life Sciences, 2002, 71(6): 623-638.
- [2] WANG Yuan-yuan, Khoo K H, Chen S T, et al. Studies on the Immuno-Modulating and Antitumor Activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) Polysaccharides: Functional and Proteomic Analyses of a Fucose-Containing Glycoprotein Fraction Responsible for the Activities [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002, 10(4): 1057-1062.
- [3] GAO Yi-huai, ZHOU Shu-feng, WEN Jian-bo, et al. Mechanism of the Antiulcerogenic Effect of *Ganoderma lucidum* Polysaccharides on Indomethacin-Induced Lesions in the Rat [J]. Life Sciences, 2002, 72(6): 731-745.
- [4] ZHENG Ke-yan, ZHANG Jie, LIN Xiang-you, et al. Anti-mutagenic Effects of Polysaccharids from *Ganoderma tsugae* [J]. Journal of Jilin University: Science Edition, 2005, 43(2): 235-237. (郑克岩,张洁,林相友,等. 松杉灵芝多糖的抗突变作用[J]. 吉林大学学报:理学版,2005,43(2):235-237.)
- [5] GAO Xiao-xia, FEI Xiao-fang, WANG Ben-xiang, et al. Effects of Polysaccharides (FI₀-b) from Mycelium of *Ganoderma tsugae* on Proinflammatory Cytokine Production by THP-1 Cells and Human PBMC (I) [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2000, 21(12): 1179-1185.
- [6] GAO Xiao-xia, WANG Ben-xiang, FEI Xiao-fang. Effects of Polysaccharides (FI₀-c) from Mycelium of *Ganoderma tsugae* on Proinflammatory Cytokine Production by THP-1 Cells and Human PBMC (II) [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2000, 21(12): 1186-1192.
- [7] GONG Yu-ying, FEI Xiao-fang, GAO Xiao-xia. Effect of Polysaccharide from *Ganoderma tsugae* on Proinflammatory Cytokine Production by THP-1 Cells and Human Peripheral Blood Mononuclear Cells [J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2001, 15(6): 401-407.
- [8] ZHU Yun-lan, SHAO Ying, CHEN An-hui, et al. Effects of *Cordyceps militaris* Polysaccharides on Ultraviolet-Induced Micronucleus Rate of *Vicia faba* Root-Tip Cells [J]. Food Science, 2009, 30(1): 177-180. (朱蕴兰,邵影,陈安徽,等. 蛹虫草多糖对紫外线诱发蚕豆根尖细胞微核的影响[J]. 食品科学,2009,30(1):177-180.)
- [9] CAO Ding-chen, GENG Bo, LIANG Li-qun, et al. The Effect on the Teratogenicity of Mouse Sperms Fed with Transgenic Carps Transferred Salmon Growth Hormone Gene [J]. Chinese Journal of Fisheries, 2009, 22(3): 40-42. (曹顶臣,耿波,梁利群,等. 转“大麻哈鱼”生长激素基因鲤对小鼠精子致畸性的影响[J]. 水产学杂志,2009,22(3):40-42.)
- [10] YU Zhong-bo, CHAI Jian-rong, TAO He, et al. Antagonism of Nano-Chitosan against Mutagenic Effect of Different Mutagens to Salmonella Typhimurium [J]. Occupation and Health, 2007, 23(19): 1684-1686. (于仲波,柴剑荣,陶核,等. 纳米化几丁聚糖对诱变剂引起的沙门菌回复突变的拮抗作用[J]. 职业与健康,2007,23(19):1684-1686.)
- [11] 刘建文,季光,魏东芝,等. 药理实验方法:新技术与新方法[M]. 北京:化学工业出版社,2003:271.