

藏黄精（卷叶黄精）多糖的遗传毒性研究

吴素丽* 王文林 王莉芳 张丽 郭东贤

陕西省食品药品检验研究院

DOI:10.32629/fcmr.v8i2.20930

[摘要] 目的: 研究藏黄精(卷叶黄精)多糖的遗传毒性。方法: 对样品进行细菌回复突变试验,哺乳动物红细胞微核试验和小鼠精原细胞染色体畸变试验。结果: 细菌回复突变试验: 在加与不加S9条件下,藏黄精(卷叶黄精)多糖各剂量组对各测试菌株回复突变菌落数均小于自发回复突变菌落数的2倍,亦与剂量高低无相关反应关系,无致基因突变作用;哺乳动物红细胞微核试验: 藏黄精(卷叶黄精)多糖各剂量组小鼠骨髓红细胞微核率与阴性对照比较差异均不显著;小鼠精原细胞染色体畸变试验: 藏黄精(卷叶黄精)多糖各剂量组小鼠精原细胞染色体畸变率与阴性对照比较差异均不显著,均为阴性。结论: 藏黄精(卷叶黄精)多糖,无致基因突变性,无遗传毒性。

[关键词] 藏黄精(卷叶黄精)多糖; 遗传毒性; 细菌回复突变; 微核; 精原细胞

中图分类号: Q2-06 **文献标识码:** A

Study of Inheritance Toxicology of XiZang Polygonatum cirrhifolium polysaccharides

Suli Wu* Wenlin Wang Lifang Wang Li Zhang Dongxian Guo

Shaanxi Institute of Food and Drug Control

[Abstract] Objective: To study the genotoxicity of Polygonatum cirrhifolium polysaccharides. Methods: Bacterial reverse mutation assay, Mammalian erythrocyte micronucleus and Chromosomal aberrations in mouse spermatogonia test were performed. Results: In the bacterial reverse-mutation test, the number of reverse-mutation colonies in each dose group of the Polygonatum cirrhifolium polysaccharides was less than 2 times of the spontaneous reverse-mutation number of each test strain, and no dose-response relationship, There was no gene mutation. In mammalian erythrocyte micronucleus test, there was no significant difference in micronucleus rate between mouse bone marrow erythrocyte and negative control group. There was no significant difference between the chromosome aberration rate of mouse spermatogonia and that of negative control group in chromosome aberration test. Conclusions: There was no genogenic mutagenicity and non-genotoxicity of XiZang Polygonatum cirrhifolium polysaccharides.

[Key word] XiZang Polygonatum cirrhifolium polysaccharides; Genotoxicity; Bacterial reverting mutation; Micronucleus; Spermatogonium

引言

黄精属于百合科黄精属多年生药用植物,药用部分主要取自滇黄精(*Polygonatum kingianum* Coll.et Hemsl)、黄精(*Polygonatum sibiricum* Red)、多花黄精(*Polygonatum cyrtoneura* Hua)的根茎部位,经干燥后使用,主要有补气、润肺、健脾、滋肾的功效。黄精在我国有着几千年的用药历史,是传统的药食同源中药。主要产于西藏东部和南部藏黄精为卷叶黄精*Polygonatum cirrhifolium* (Wall) Roylez。在藏医药古籍中都有记载,藏黄精具有滋补、延年益寿等作用,黄精的主要活性成分是黄精多糖、皂苷等。现代药理学研究表明,黄精多糖可增强机体免疫力、改善提高记忆能力^[1]、降血糖^[2]、降血脂^[3]、抗肿瘤^{[4][5]}、抗氧化、抗炎抑菌、提高肝肾

功能改善骨质疏松等多种作用,具有很高的应用价值。

近年来,对黄精多糖的功效和机制研究取得很大进展,但其安全性方面研究较少,尤其是藏黄精,本文主要对藏黄精多糖在遗传毒方面进行研究,为藏黄精多糖在保健食品和化妆品中的应用打下基础。

1 材料与仪器设备

1.1 样品

藏黄精(卷叶黄精)多糖,西藏食品药品检验研究院提供。

1.2 试验动物及饲养环境

SPF级KM小鼠,购自西安交通大学医学部实验动物中心。实验动物生产许可证号: SCXK(陕)2023-002。

饲养环境：饲养于陕西省食品药品检验研究院屏障环境，温度22℃～26℃，相对湿度为40%～70%，昼夜明暗交替时间12h/12h。实验动物使用许可证号SYXK(陕)2023-002。

1.3菌株

试验菌株为鉴定合格的组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌TA97a、TA98、TA100、TA102和TA1535，购自宁波明舟生物科技有限公司。体外活化系统为多氯联苯诱导的大鼠肝匀浆制备的S9匀浆液，购自无锡欣润生物科技有限公司。

1.4试剂

敌克松，叠氮钠，2-氨基苄，2-氨基蒽，1，8-二羟基蒽醌，环磷酰胺，二甲基亚砷等购自上海麦克林生化科技有限公司。

1.5仪器

电子天平(ME203/02, METTLER TOLEDO)，电子天平(赛多利斯仪器有限公司，型号BS2202S)，电子分析天平(AE-240, METTLER TOLEDO)；生化培养箱(型号BSP-250, 上海博迅仪器有限公司)；生物安全柜(型号BSC1000-II-B2, 山东新华医疗器械股份有限公司)；水浴恒温振荡器(型号WHY-2WS, 常州中捷实验仪器制造有限公司)；压力蒸汽灭菌锅(型号DGL-75G, 江苏登冠医疗器械有限公司)。显微镜(型号BX43+DP27, OLYMPUS)。解剖器材、载玻片、离心管等。

2 试验方法

2.1细菌回复突变试验

采用经鉴定合格的5种标准测试菌株TA97a、TA98、TA100、TA102 和TA1535，体外代谢活化系统为多氯联苯(PCB)诱导的大鼠肝匀浆。试验设5000μg/皿、1581μg /皿、500μg /皿、158μg /皿、50μg /皿 5个剂量，阴性对照为DMSO与灭菌注射用水。阳性对照分为非活化系统(-S9)与活化系统(+S9)，-S9：TA97a、TA98、TA102：敌克松 50 μ g /皿，TA100和TA1535：叠氮钠1.5 μ g /皿。+S9：TA97a、TA98、TA100：二氨基苄10 μ g /皿，TA102：1，8-二羟基蒽醌：50 μ g /皿，TA1535：2-氨基蒽20 μ g /皿。每个剂量三个平皿，相同条件下进行两次重复试验。

2.2哺乳动物红细胞微核试验

采用30小时两次灌胃法进行试验。小鼠体重25-30g，随机分为5组，每组10只动物，雌雄各半。受试物剂量为10、5、2.5g/kg. BW，阴性对照：纯化水，阳性对照：环磷酰胺，给药剂量为40m

g/kg. BW。灌胃体积：20mL/kg. BW。最后一次给药后6h颈椎脱臼法处死小鼠，取小牛血清滴于玻片上，分离股骨肌肉，取股骨髓与血清混匀，经常规涂片-干燥-甲醇固定-Giemsa染色-蒸馏水冲洗-自然晾干后，每只小鼠油镜下观察每2000个嗜多染红细胞(PCE)中含有的微核细胞数，计算微核千分率；并在有油镜下观察200个红细胞，计数PCE，并计算嗜多染红细胞在总红细胞中的比值(PCE/RBC)。

2.3小鼠精原细胞染色体畸变试验

健康合格雄性小鼠3 0只，体重26～30g，随机分为6组，每组5只。受试物剂量为10、5、2.5g/kg. BW，阴性对照：纯化水、阳性对照：环磷酰胺(40mg/kg. BW)。高剂量组在给药后24h和48h处死动物采样，其余组均在给予受试物后24h处死小鼠，小鼠处死前3h-5h按6mg/kg. BW经腹腔注射秋水仙碱(注射体积10mL/kg)。采用颈椎脱臼法处死，剥离睾丸，使用1%枸橼酸钠溶液清洗三遍，分离曲精细管，加入10mL1%柠檬酸三钠，吹打曲精细管，静置2min，吸尽上清后再加入10mL1%柠檬酸三钠处理10min，离心，去除上清后加入10mL固定液固定10min，离心，去上清，再加入10mL固定液，4° C固定过夜后，离心去上清，加入2mL60%冰乙酸软化后立即加入4mL固定液，吹打混匀，离心后去除大部分上清，留约1.0mL，充分吹打混匀制成细胞溶液，均匀滴于冰玻片上，空气干燥，姬姆萨应用液染色10min，蒸馏水冲洗，晾干。油镜下观察，每只动物需检查100个中期分裂相细胞，记录细胞中染色体的畸变类型、畸变数量，计算畸变细胞率。每只动物需观察1000个细胞以计算精原细胞的有丝分裂指数。

2.4数据处理

使用SPSS25.0软件进行均数，标准差计算和方差分析或卡方检验，P<0.05具有统计学意义。

3 结果

3.1细菌回复突变试验

在+S9与-S9条件下，藏黄精(卷叶黄精)多糖各剂量组对各测试菌株回复突变菌落数均小于自发回复突变菌落数的2倍，亦与剂量高低无相关反应关系，无致基因突变作用，结果表明在加与不加S9情况下，藏黄精(卷叶黄精)多糖对鼠伤寒沙门氏菌TA97a、TA98、TA100、TA102和TA1535 5株试验菌株均无遗传毒性作用，结果见表1。

表1 藏黄精(卷叶黄精)多糖细菌回复突变试验结果

剂量组(μg/皿)	TA97a		TA98		TA100		TA102		TA1535	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
50	90±13	101±8	35±6	32±9	113±7	111±12	220±16	194±37	18±4	14±5
158	77±6	115±9	28±7	29±3	116±8	133±22	237±17	199±13	14±3	13±4
500	81±14	97±5	39±6	25±4	115±7	116±14	228±11	214±15	15±5	12±2
1581	66±7	105±12	30±5	25±5	114±11	125±23	227±23	196±19	13±4	14±3
5000	76±7	103±12	32±9	29±5	119±18	120±12	207±29	214±18	16±5	12±5
自发突变	103±10	103±10	41±2	41±2	137±34	137±34	252±12	252±12	16±4	16±4
溶媒对照	77±6	83±7	44±6	42±8	125±11	125±7	234±6	225±17	14±3	11±3
阳性对照	2124±80	1300±180	1170±84	2374±40	2431±443	2580±400	973±44	969±17	454±96	400±53

表 2 臧黄精 (卷叶黄精) 多糖哺乳动物红细胞微核试验结果

性别	剂量(g/kg)	动物(只)	受检PCE 数(个)	微核细胞数(个)	微核率(%) $\bar{x} \pm sD$	PCE(个) $\bar{x} \pm sD$	PCE/RBC $\bar{x} \pm sD$
雄	10	5	10000	11	1.10±0.42	96.00±3.16	0.48±0.02
	5	5	10000	12	1.20±0.57	99.20±6.22	0.50±0.03
	2.5	5	10000	14	1.40±0.42	97.40±2.41	0.49±0.01
	阴性对照组	5	10000	12	1.20±0.27	98.00±2.55	0.49±0.01
	阳性对照组	5	10000	171	17.10±1.52**	98.80±3.49	0.49±0.02
雌	10	5	10000	12	1.20±0.27	95.60±3.85	0.48±0.02
	5	5	10000	12	1.20±0.27	96.20±5.17	0.48±0.03
	2.5	5	10000	9	0.90±0.22	95.60±5.08	0.48±0.03
	阴性对照组	5	10000	13	1.30±0.45	100.20±3.96	0.50±0.02
	阳性对照组	5	10000	156	15.60±1.56**	98.60±4.62	0.49±0.02

注：**表示 P<0.01

表 3 臧黄精 (卷叶黄精) 多糖小鼠精原细胞染色体畸变试验结果

剂量(g/kg)	动物数(只)	有丝分裂指数(%)	畸变细胞数(个)	染色体畸变总数(个)	畸变细胞率(%)	染色体总畸变率%
10(24h)	5	21.32±0.72	2	2	0.40±0.89	0.40±0.44
10(48h)	5	20.44±1.17	2	2	0.40±0.55	0.40±0.44
5	5	20.38±1.28	1	2	0.20±0.45	0.40±0.44
2.5	5	20.72±0.79	1	1	0.20±0.45	0.20±0.33
阴性对照组	5	20.46±1.04	1	2	0.20±0.45	0.40±0.44
阳性对照组	5	21.00±0.95	34	37	6.80±1.30**	7.40±1.14**

注：**表示 P<0.01。

3. 2哺乳动物红细胞微核试验

藏黄精 (卷叶黄精) 多糖各剂量组骨髓红细胞微核率与阴性对照组比较, 差异均不显著 ($P>0.05$), 而阳性对照组与阴性对照组相比较, 差异极显著 ($P<0.01$), 说明藏黄精 (卷叶黄精) 多糖无致小鼠骨髓红细胞微核作用, 结果见表2。

3. 3小鼠精原细胞染色体畸变试验

藏黄精 (卷叶黄精) 多糖各剂量组小鼠精原细胞染色体畸变率与阴性对照组比较, 差异均无显著性 ($P>0.05$), 而阳性对照组与阴性对照组比较, 差异极显著 ($P<0.01$), 说明藏黄精 (卷叶黄精) 多糖不能导致小鼠精原细胞染色体产生畸变作用, 结果见表3。

4 结论

本研究对藏黄精 (卷叶黄精) 多糖进行了三项遗传毒性试验: 细菌回复突变、哺乳动物红细胞微核及小鼠精原细胞染色体畸变试验, 三项试验结果均为阴性, 说明藏黄精多糖无遗传毒性作用。研究表明, 黄精多糖多具有一定的抑菌活性, 金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌革兰氏阳性细菌最为敏感, 大肠杆菌、沙门氏菌革兰氏阴性菌中度敏感, 且抑菌效果与黄精多糖的浓度呈正相关, 2%浓度的黄精多糖可以抑制沙门氏菌的生长, 本研究中细菌回复突变试验使用的沙门氏菌是经过基因改造的组氨酸缺陷的工程菌, 且最高剂量为5mg/皿, 未达到抑菌浓度, 未对试验结果造成影响。

随着中医药的发展, 黄精多糖越来越多的功效被挖掘出来, 尤其是黄精多糖在抗衰老、抗氧化、降血糖, 降血脂方面的功能得到保健食品和食品行业的广泛关注, 一些研究者和企业也相

继开发出一系列功能性食品或保健品, 对黄精的需求量也日益增加, 人工种植黄精面临农残、重金属超标等问题, 而处于西藏的野生黄精资源丰富, 蕴藏量大, 无污染, 且都处于未开发利用的野生繁殖状态, 前期研究发现臧黄精中多糖的含量是中药黄精多糖含量的一倍多。对臧黄精多糖进行安全性评价与研究, 充分开发利用藏区黄精资源, 将藏黄精应用于食品、化妆品等领域, 无疑将有巨大的市场前景, 有利于促进藏药产业的健康发展和藏区经济社会的发展。

[参考文献]

[1]Cui X,Wang S,Cao H,et al.A review:The bioactivities and pharmacological applications of Polygonatum sibiricum polysaccharides[J].Molecules,2018,23(5):1170.

[2]Zhao X,Patil S,Qian A,etal.Bioactive compounds of Polygonatum sibiricum—Therapeutic effect and biological activity[J].Endocr Metab Immune Disord Drug Targets,2022,22(1):26–37.

[3]汪光军,李九九.黄精多糖预防小鼠糖脂代谢紊乱的作用研究[J].食品安全质量检测学报,2020,11(21):7829–7836.

[4]段华,王保奇,张跃文.黄精多糖对肝癌H22移植瘤小鼠的抑瘤作用及机制研究[J].中药新药与临床药理,2014,25(1):5–7.

[5]林辰,徐秀文,李欣,等.黄精多糖抑制宫颈癌C–33A细胞增殖作用的研究[J].CJCM中医临床研究,2021,13(31):56–58.

*通讯作者:

吴素丽(1981--),女,汉族,河南漯河人,博士研究生,主管药师,主要从事药品安全性评价研究。