

文章编号: 1672-3384 (2009) -02-0009-05

常用中药的 DNA 毒性研究

【作者】 吴春福 杨静玉 王芳 段链 王大方 高广 张秋华 涂凌 金顺姬

沈阳药科大学 (沈阳 110016)

【中图分类号】 R258.1

【文献标识码】 A

1 中药毒性研究的重要性

中药的应用历史源远流长,在数千年的实践中积累了大量临床应用经验,相对于人工合成的化学药而言,多数中药具有作用缓和、毒性低的特点。但客观地讲,凡是药物都具有两重性,既可治疗疾病,又可产生不良反应。事实上,人们对中药毒性早有认识,早在一千多年前,《神农本草经》把所收录的 365 种药物,按无毒、有毒和毒性大小分为上、中、下品。近年来有关中药引起的不良反应和药源性疾病的报道在世界范围内也引起了人们广泛的关注,如含马兜铃酸中药引起肾脏损害^[1,2]、口服五加皮致死^[3]等,这在一定程度上成为制约中医药走向世界的瓶颈之一。因此,开展中药毒性研究,就显得尤为重要。

2 中药特殊毒性研究方法的进展

目前,国内对中药毒性评价已有一套较成熟的方法。中药新药申报需提供相关毒理学的试验及文献资料,主要包括急性毒性、长期毒性,与局部、全身给药相关的特殊安全性试验和文献资料。除此之外,还需要根据相关要求通过经典成熟的 Ames 法、染色体畸变、姐妹染色体交换以及微核技术等进行遗传毒性,生殖毒性和致癌性试验^[4],评价中药特殊毒性。

随着生命科学的迅猛发展,分子生物学技术已经渗透到医学、药学等相关领域,使内在格局发生巨大变革。运用单细胞凝胶电泳技术(single cell gel electrophoresis assay, SCGE)^[5,6]、穿梭质粒技术(shuttle plasmid)^[7,8,9]、差异显示技术(differential display)^[7,10]、基因芯片技术(gene

chip)^[7,11,12]、流式细胞术(flow cytometry)^[13]、转基因动物模型(transgenic animals)^[7,14,15]等先进的分子生物学技术会极大加快药物毒理,特别是特殊毒理学的发展进程,提高分析的准确度和精确度。然而,应用这些先进的技术来研究中药毒性还处于初步探索阶段。中药毒理学研究应大力借鉴和引入这些新技术,发展和完善自身理论体系,使之与现代科学研究接轨,使中药毒理,特别是特殊毒理学研究的进入一个更高的层次^[7]。

3 常用中药的 DNA 毒性研究

单细胞凝胶电泳技术(single cell gel electrophoresis assay, SCGE)是 20 世纪 80 年代发展起来的一种在单细胞水平上检测真核细胞 DNA 损伤与修复的方法,又称彗星试验(comet assay)。因为毒性物质或自由基攻击而产生的氧化应激会造成 DNA 受损发生链断裂,在电场力作用下,细胞核中带阴电荷的 DNA 断片向阳极移动,形成“彗星”状图像。因此通过测定 DNA 迁移部分的光密度或迁移长度可定量测定 DNA 损伤程度^[5]。SCGE 目前主要应用于 DNA 损伤与修复、遗传毒理学、环境生物监测等研究^[6]。由于彗星试验具有检测谱宽、简便与快速、灵敏性好、所需细胞样本量少、方便易行等显著优于常规药物毒性检测技术的优点,它已被尝试用于中药 DNA 毒性的检测。例如采用此技术检测到关木通对细胞 DNA 损伤作用,预测了其可能的遗传毒性^[16]。本实验室自 2002 年始,将彗星试验技术应用于中药和天然产物对 DNA 损伤的影响的系统研究,在实验技术方法改进^[17]、中药单味药^[18]、药对^[19]、方剂^[20,21,22]、天然产物单体^[23,24]对外周血细胞 DNA

损伤和保护等方面积累了丰富的经验。

我们采用此技术对常用的清热解毒药、解表药、理气药、补益药、安神药及开窍药 6 大类 94 种单味药、37 个药对和方剂麻黄汤对小鼠外周血细胞 DNA 损伤作用进行了系统研究,以期用可靠、准确的科学数据和理论阐述常见中药的基因安全性。按照《现代中药学大辞典》及《中医临床常用药对手册》所定剂量,我们将受试药物常规煎煮,按照临床等效量 1/3、相同和 3 倍临床给药量灌胃给予小鼠 1d、3d 和 7d 后,分别于末次给药 1 小时经眼眶采血,进行全血的彗星试验分析,得到细胞彗星图的头和尾 DNA 含量、尾矩、Olive 矩以及头和尾的面积等,包含有形态指标、强度指标、矩类指标的各项定量指标,而后采用分析软件对细胞 DNA 损伤的程度进行精确评价。

3.1 单味药的 DNA 毒性

3.1.1 清热解毒药 我们研究的 24 种清热解毒药包括:金银花、连翘、大青叶、青黛、板蓝根、穿心莲、贯众、忍冬藤、紫花地丁、蒲公英、野菊花、重楼、半枝莲、鱼腥草、皂角刺、败酱、漏芦、马齿苋、白头翁、秦皮、山豆根、射干、胖大海、北豆根。其中,仅金银花、马齿苋在 3 个剂量、3 个时间点对小鼠外周血淋巴细胞 DNA 均无损伤作用;贯众、板蓝根 3 个剂量、3 个时间点对小鼠外周血淋巴细胞 DNA 均有损伤作用;其他各药在不同给药时间和不同剂量下均对小鼠外周血细胞 DNA 产生不同程度的损伤。中医认为,本类药多为苦寒之品。现代研究表明,苦寒中药中以生物碱、苷类成分为多,而生物碱类、苷类、黄酮类、挥发油类、鞣质、砷及砷化物类是中药致癌、致突变的主要化学成分^[25,26]。这些都可能是清热解毒药造成细胞 DNA 损伤的因素。已有报道,清热解毒药长期应用可产生致畸、致癌、致突变的作用,如板蓝根可引起染色体畸变^[27]。我们的研究结果从另一个角度再次说明了这种毒性的存在。

3.1.2 解表药 我们研究的 20 味解表药,其中

辛温解表药有:麻黄、桂枝、紫苏、荆芥、防风、羌活、白芷、藁本、辛夷、细辛、苍耳子;辛凉解表药有:薄荷、桑叶、葛根、柴胡、菊花、蝉蜕、蔓荆子、淡豆豉、升麻。结果表明白芷、羌活、藁本、菊花、桑叶、薄荷、葛根、柴胡 3 个剂量、3 个时间点对小鼠外周血淋巴细胞 DNA 均无损伤作用;苍耳子、细辛 3 个剂量、3 个时间点对小鼠外周血淋巴细胞 DNA 均有损伤作用;而麻黄、荆芥、防风、蝉蜕、桂枝、辛夷、升麻、蔓荆子、淡豆豉、紫苏虽其对 DNA 的损伤规律不尽相同,但都不同程度地造成了损伤。解表药中辛味药占 88.9%,辛味药主要含有挥发油,其次是苷类、生物碱等。这些物质都可能造成解表药在不同用药时间,不同给药剂量下对细胞 DNA 产生损伤。如细辛挥发油致突变作用是否与其含有的黄樟醚有关,值得进一步深入研究^[28]。

3.1.3 理气药 理气药中临床常用的有:陈皮、薤白、香附、枳实、佛手、荔枝核、玫瑰花、青皮、香橼、刀豆、木香、沉香、川楝子、甘松、乌药、柿蒂、大腹皮、九香虫。我们对这 18 味理气药均进行了研究,发现前 9 味药对小鼠外周血细胞 DNA 无损伤作用,而后 9 味药在不同给药时间不同剂量下均可对小鼠外周血细胞 DNA 产生了不同程度的损伤,提示这些理气药的遗传毒性各不相同。初步分析可以发现此类中药的成分亦多是挥发油、苷类、鞣质等,这些都是中药致癌、致突变的主要化学成分^[25,26]。

3.1.4 补益药 在补益药中我们选取了常见的 10 味补气药:人参、西洋参、党参、黄芪、白术、山药、甘草、太子参、白扁豆、大枣和 6 味补血药当归、熟地、何首乌、阿胶、龙眼肉、白芍。结果发现,大多数的补气、补血中药包括西洋参、党参、黄芪、白术、甘草、太子参、白扁豆、大枣、阿胶、龙眼肉对小鼠外周血细胞 DNA 无损伤作用;而人参仅在 3 倍临床等效量给药 7d 时,出现对 DNA 的损伤。其他补益药山药、当归、何首乌、白芍、熟地对小鼠外周血细胞 DNA 有不同程

度的损伤作用。尽管大量临床文献表明,大部分补益类中药具有安全性好,毒副作用小的特点,但在临床应用中使用不当也会导致不良反应的发生。大剂量和长期服药是补益类中药发生不良反应的主要原因之一。

3.1.5 安神药 研究了常用的重镇安神药朱砂、磁石、龙骨、琥珀和养心安神药酸枣仁、远志、合欢皮、夜交藤、柏子仁。结果显示,酸枣仁、柏子仁、远志、夜交藤对小鼠外周血细胞 DNA 没有损伤作用,而朱砂、磁石、龙骨、琥珀、合欢皮对小鼠外周血细胞 DNA 呈现不同程度的损伤作用。此结果提示在安神药中矿物类较植物类中药普遍表现出更强的 DNA 损伤作用。

3.1.6 开窍药 研究结果表明,在 7 种常用的开窍药麝香、冰片、苏合香、安息香、樟脑、蟾酥、石菖蒲中,仅苏合香对小鼠外周血细胞 DNA 没有损伤作用,而麝香、冰片、樟脑、安息香、蟾酥、石菖蒲对小鼠外周血细胞 DNA 呈现不同程度的损伤作用。

本实验室对 6 大类 94 种常用单味药进行的研究发现,清热解毒药具有 DNA 损伤作用的中药最多,为 91.7%。其次为安神和开窍药,其中有 68.7% 具有 DNA 损伤作用。解表药中有 60%,理气药中有 50% 具有 DNA 损伤作用。DNA 损伤作用最少的为补益药,仅有 18.8% 具有 DNA 损伤作用。在众多造成 DNA 损伤的单味药中,随给药剂量的变化对细胞 DNA 的损伤程度有所不同,随给药时间的变化对细胞 DNA 的损伤程度也有变化,即各单味药产生毒性作用的主要成分及作用方式各不相同,这也可能与各味药中所含不同成分间的相互作用有关。因此只能在临床具体用药时具体分析。

3.2 中药药对的 DNA 毒性

药对,亦称对药,是在中医临床中广泛应用而且相对固定的两味中药配伍形式,它又是复方的主干,也是配伍的基础。研究药对配伍后对细胞 DNA 的作用,对于进一步研究其作用机制以及

指导临床使用都更具有意义。本文选用了临床常用的 9 个清热解毒药的药对,8 个解表药的药对,6 个理气药的药对,8 个补益药的药对,6 个安神和开窍药的药对,从 DNA 损伤的角度对其配伍安全性进行研究。

3.2.1 配伍后对细胞 DNA 损伤作用减弱或无损伤作用 虽然药对中的其中一味药单独使用会对细胞 DNA 产生损伤作用,但配伍成药对后,对细胞 DNA 的损伤性减弱或者消失。如连翘(1/3d 临床等效量 $\times 1$ 、3d)本身对外周血液淋巴细胞有损伤作用,与金银花合用后对细胞 DNA 无明显毒性。提示,金银花本身对细胞 DNA 有保护作用,这为进一步研究对细胞 DNA 损伤有保护作用的化学成分提供了线索。

另外,还有一些药对是两味单味药在单独使用时都会对细胞 DNA 产生损伤作用,而二者合用时对细胞 DNA 损伤作用消失。推测可能是两味药中不同的化学成分在联合使用时起到了“相畏、相杀”的功效。如射干—山豆根(3 倍临床等效量 $\times 7d$)药对。

除此之外,还有一些药对,在不同剂量、不同给药时间,两种单味药对细胞 DNA 均无影响,合用后对细胞 DNA 也无作用,如酸枣仁—远志(1/3、1、3 倍临床等效量 $\times 1$ 、3、7d)等药对。提示这些药对使用的初衷是为了药效的协同,而非毒性的相克。

3.2.2 配伍后对细胞 DNA 的损伤作用加强 实验研究发现,有些药对中的两种单味药在单独使用时对细胞 DNA 均无明显影响,而二者配伍应用时,会对细胞 DNA 产生一定的损伤作用,如夏枯草—蒲公英(1/3, 临床等效量 $\times 1d$),麝香—冰片(1/3 \times 临床等效量 $\times 3$ 、7d)药对。可能由于不同化学成分在不同给药时间和给药剂量下所产生的协同作用所致。

有些药对中的一味单独使用对细胞 DNA 有损伤作用,而另一味单独使用对细胞的 DNA 无明显影响,二者配伍应用时,对细胞 DNA 会产生一定

的损伤作用。如元胡一川楝子（1/3 临床等效量 × 7d）等药对。推测配伍后产生的损伤性有可能是对细胞 DNA 有损伤作用的单味药单独发挥作用的结果，也可能是二药合用后不同化学成分相互作用产生的结果，或是二者累加。

另有一些药对两种单味药及二者配伍应用对细胞 DNA 均有损伤作用。这种情况在今后中药毒理学研究及临床应用方面都应给予重视。

3.3 麻黄汤对细胞 DNA 的损伤作用^[21]

麻黄汤出自《伤寒论》，麻黄汤是治疗外感风寒表实证的代表方剂。其配伍精当，是历代中医学家倍为推崇的著名方剂^[29]。现代研究也表明该方具有解热、促腺体分泌、抗病毒、镇咳、祛痰等作用^[30]。我们采用单细胞凝胶电泳技术结合正交设计方法研究麻黄汤对小鼠外周血淋巴细胞 DNA 的损伤作用。给药 7d，麻黄对淋巴细胞 DNA 产生了显著损伤，而组成麻黄汤后对小鼠外周血淋巴细胞 DNA 损伤作用消失，分析结果显示，与桂枝、甘草分别与麻黄合用能显著降低麻黄的损伤作用。

清热解毒药、补益药、解表药、理气药和安神开窍药在临床应用十分广泛，我们的研究结果将有助于我们进一步认识中药毒性的分子机制，也将促进中药安全性评价的研究。相关的配伍研究对于从毒理学角度解释中药的配伍机制也具有的重要意义。同时，通过以上结果也可以看出，单细胞凝胶电泳技术在中药的特殊安全性评价中具有明显的优势，如果能与其他技术手段紧密配合，诸如，与中药化学的配合，将有利于找出中药产生 DNA 毒性的化学成分，得到中药确实可靠的安全性情报，提高中药的临床前安全性评价的质量。

4 中药安全性评价的现代发展要求与趋势

中药安全性评价是中药现代化的重要一环，用新技术新方法进行药物毒性机制的研究，是国际上一个重要的发展趋势。中药的特殊毒性的评价必须在保证检测数据的可靠性的同时，引进先

进的分子生物学等新技术和新方法，深入进行毒性机制的研究，以提高安全性评价的技术分析水平。总之，根据国际市场的发展需要，在现阶段中药研究水平不断提高的基础上，参考现代医药研究的国际规范，吸收国际上前沿的发展技术，完善和建立符合中医药特点并达到国际认可中药安全性评价规范极为必要，也将有利于进一步提高中药的国际地位，扩大中药的国际市场。

【参考文献】

- [1] Vanherweghem JL, Depierreux M, Tielemans C, et al. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet*, 1993, 341 (8842): 387-391
- [2] 桑健. 木通中毒致急性肾衰竭 1 例. *中国中西医结合肾病杂志*, 2001, 2 (6): 357
- [3] 沈荣基, 沈翠娥. 口服五加皮中毒死亡 1 例报告. *福建中医药*, 2001, 32 (4): 20
- [4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学, 第三版, 北京: 人民卫生出版社, 2002: 226-245
- [5] Vijayalaxmi, Tice RR, Strauss GH. Assessment of radiation - induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis technique. *Mutat Res*, 1992, 271 (3): 243-252
- [6] 宋博, 郑履康. 单细胞凝胶电泳技术的应用与进展. *中国职业医学*, 2000, 27 (6): 45-46
- [7] 孙蓉, 张丽美, 尹建伟, 等. 分子生物学技术在中药毒理学研究中的应用前景. *药物警戒*, 2006, 3 (6): 339-345
- [8] 范奇元, 李寿棋, 傅继梁, 等. EMS 对穿梭质粒 PZ189 诱变作用的初步研究. *华西医学报*, 1992, 23 (3): 293-296
- [9] 谈幸之, 李申德, 罗素云, 等. Psp189/vero E6 细胞检测系统的建立及其在筛选霉菌毒素诱变性中的应用. *卫生研究*, 1996, 25 (6): 365-367
- [10] 卫秦芝, 庄志雄. mRNA 差异显示技术及在毒理学研究中的应用. *中国公共卫生*, 2005, 21 (3): 262-265
- [11] 张永清, 黄高昇, 刘红娟, 等. 基因芯片研究苦参碱诱导 K562 细胞基因表达谱变化. *第四军医大学学报*, *中华实用中西医杂志*, 2004, 25 (6): 01
- [12] 周联, 王培训, 赖小平, 等. 基因芯片在中药复方研究中的应用. *中药新药与临床药理*, 2002, 13 (6): 383-384
- [13] 李志, 杨明杰, 周建嫦. 流式细胞术在毒理学检测中的应用

- 用. 卫生研究, 2004, 33 (4): 504-507
- [14] 张贺, 王承利, 王洋. 转基因动物研究进展. 动物医学进展, 2008, 29 (7): 59-62
- [15] 周莉, 李岩, 高虹, 等. 转基因动物在毒理学中的应用. 毒理学杂志, 2007, 21 (4): 344
- [16] 刘斌, 艾刚, 岑小波, 等. 关木通两种提取液对 V79 细胞 DNA 的损伤作用. 华西药科学杂志, 2003, 18 (1): 13-15
- [17] 段链, 杨静玉, 于海, 等. 替星试验中全血法与分离淋巴细胞法的比较. 癌变畸变突变, 2004, 16 (9): 307-309
- [18] Zhang QH, Wu CF, Duan L, et al. Protective effects of total saponins from stem and leaf of Panax ginseng against cyclophosphamide - induced genotoxicity and apoptosis in mouse bone marrow cells and peripheral lymphocyte cells. Food Chem Toxicol, 2008, 46 (1): 293-302
- [19] Zhang QH, Wu CF, Duan L, et al. Genotoxic studies on Panax ginseng and Polygonum multitorum and their combination in mouse peripheral lymphocyte cells. AJTM, 2007, 2 (4): 127-134
- [20] 金顺姬, 段链, 黄梅, 等. 白藜芦醇和抗坏血酸对预防非典型肺炎方剂 I 和 VI 所致小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤的保护作用. 中草药, 2003, 34 (12): 1114-1117
- [21] 王大方, 高广, 杨静玉, 等. 正交设计法研究麻黄汤对小鼠外周血淋巴细胞 DNA 的损伤作用. 中药药理与临床, 2006; 22 (3): 7-9
- [22] 金顺姬, 段链, 黄梅, 等. 预防非典型肺炎方剂对小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤的影响. 中草药, 2003, 34 (8): 733-735
- [23] Guo L, Wang LH, Sun B, et al. Direct in vivo Evidence of Protective Effects of Grape Seed Procyanidin Fractions and Other Antioxidants against Ethanol - Induced Oxidative DNA Damage in Mouse Brain Cells. Agric Food Chem, 2007, 55 (14): 5881-5891
- [24] Zhang QH, Wu CF, Duan L, et al. Protective effects of ginsenoside Rg3 against cyclophosphamide - induced DNA damage and cell apoptosis in mice. Arch Toxicol, 2008, 82 (2): 117-123
- [25] 王钦茂, 李莉, 方华武, 等. 中药致癌、致突变和生殖毒性研究概况. 安徽医学院学报, 2001, 20 (5): 64-67
- [26] 王瑞, 胡边, 殷学军. 中药遗传毒理学研究进展. 中成药, 2002, 24 (1): 57-59
- [27] 胡祖光, 李庚华, 叶珊. 中草药致突变及抗突变的研究. 中药药理与临床, 1992, 8 (1): 46-48
- [28] 徐军, 胡月娟, 纪绿屏. 细辛油的血管平滑肌作用及致突变作用研究. 中成药, 1992, 14 (12): 32-33
- [29] 马艳春, 肖洪彬, 郑春英, 等. 麻黄汤配伍规律的实验研究. 中医药研究, 2002, 18 (2): 36
- [30] 张绍杰, 王孝先. 麻黄汤的实验研究及临床应用. 新疆中医药, 1992, 23 (2): 40-42

文章编号: 1672-3384 (2009) -02-0013-05

中医药在德国的市场现状

【作者】理查德·傅莱 (Richard Frey)

德国市场经济信息公司 (德国 40237)

【中图分类号】R2

【文献标识码】B

改革开放 30 年来, 东西方文化与科学技术的交流有了很大的发展, 中国的国粹——中医药也加快了走出国门的步伐。包括德国在内的欧洲国家, 对中医传统植物药疗效的认可有了很大的提高。中医中药已经为世界人民的健康, 做出了巨大的贡献。

中医能遍及全球的原因有很多方面, 一方面是由于大量的西方留学生到中国学习传统中医,

为数不少的中国中医医生也走出国门, 到国外去开办中医院、中医诊所和学习班等等, 将中医传播到了世界各地。另一方面, 当人们发现某些疾病西医的治疗效果有限并导致很多不良反应后, 便开始寻找其他的诊治方法, 传统医学和自然疗法逐渐被欧洲所重视。中国、泰国、印度, 中东和非洲等的传统医术, 在欧洲都纷纷出现, 其中中国传统医学最受瞩目。医疗市场的竞争也是近