

## 昆明山海棠雄性抗生育活性提取物 TH5 的毒性评价

周激文 骆毅 刘黎闻 潘汝能 彭林 吴大刚 张宪民

**摘要** 目的:对昆明山海棠雄性抗生育活性提取物 TH5 的毒性试验结果进行评价。方法:TH5 的毒性试验用急性毒性试验(LD<sub>50</sub>)、Ames 试验、CHL 细胞染色体畸变试验及微核试验方法进行检测。结果:TH5 之 LD<sub>50</sub> 为 3.27g/kg;Ames 试验在 0.5~5 000μg/皿 5 个剂量范围内加与不加 S<sub>9</sub> 条件下,4 个菌株的回变菌落数均未有 2 倍增加;TH5 之 CHL 细胞染色体畸变试验在其最终浓度为 1/4IC<sub>50</sub>、1/2IC<sub>50</sub> 及 IC<sub>50</sub>(11~44μg/ml)时无论加 S<sub>9</sub> 与否,细胞畸变率与溶剂对照组无显著差异(P>0.05);TH5 在 30~300mg/kg 3 个剂量水平其微核率与溶剂对照组也均无显著差异(P>0.05)。结论:TH5 的抗生育有效剂量(116mg/kg)范围内 3 种诱变试验结果均为阴性,仍不失其开发价值。

**关键词** 昆明山海棠 提取物 TH5 雄性抗生育 突变 畸变

**Appraisal on the Toxicity of TH5 of the Male Antifertility Activity Extracts in Tripterygium Hypoglaucom (Levees) Hutch.** Zhou Jiwen, Luo Yi, Liu Liwen, et al. Yunnan Family Planning Institute, Kunming, 650021.

**Abstract** Objective: To appraise the toxicity of TH5 of the male antifertility activity extracts in Tripterygium Hypoglaucom (Levees) Hutch. Methods: The toxicity of TH5 was examined using LD<sub>50</sub>, Ames test, CHL cell chromosome aberration test and micronuclei test. Results: LD<sub>50</sub> of 0.5~5000μg/plate did not increase the number of reversion mutation (<2) in any one of the four stains with S<sub>9</sub> or without S<sub>9</sub> in Ames test. In CHL cell chromosome aberration test, the cell teratogenesis ration of TH5 was no significant difference compared with the solvent control group(P>0.05). Concentration ranged from 1/4 IC<sub>50</sub> to IC<sub>50</sub> (11~44) μg/ml, +S<sub>9</sub> or -S<sub>9</sub>. The frequencies of micronucleus cell of TH5 in 3groups(30,150,300mg/kg) were no significant difference compared with the solvent control group (P>0.05). Conclusion: The mutagenicity of TH5 in the antifertility active dose(116mg/kg) were negative.

**Key words** Tripterygium Hypoglaucom (Levees.) Hutch TH5 extract Male antifertility Mutagenesis Teratogenesis

昆明山海棠 [Tripterygium Hypoglaucom (Level.) Hutch] 为中国特有植物,主要分布于中国西南地区。《药典》示其片剂治疗“祛风除湿、舒筋活络、清热解毒,用于类风湿性关节炎,红斑狼疮”<sup>[1]</sup>。

近 10 多年来,有关昆明山海棠提取物的抗生育研究已屡有报道<sup>[2]</sup>。为了开发男性避孕新药,笔者对昆明山海棠的乙醇提取物经去除生物碱后以溶剂及硅胶柱层析法划分若干部分后所得物质 TH5,进行了系统的雄性抗生育活性试验及其相关免疫学、内分泌学及毒理学等检测。本文报告其急性毒性试验(LD<sub>50</sub>)及 A-

mes 试验、CHL 细胞染色体畸变试验与微核试验的检测结果并进行评价。

### 材料与方法

#### 一、TH5 提取物

TH5 系昆明山海棠根的乙醇提取物经去除生物碱后,再以溶剂及硅胶柱层析法划分为若干部分所得之一物质,得率约 5%,组分介于粗提物与单体化合物之间,为褐黄色晶状粉末,纯度在 90% 以上。

#### 二、急性毒性试验

选用合格、健康 ICR 小鼠(云南省天然药物药理重点实验室动物室提供)50 只,雌雄各半,体重 18~22g。随机分为 5

收稿日期:2002-07-31

作者:周激文 云南省计划生育研究所(昆明,650021)  
骆毅 云南省计划生育研究所  
刘黎闻 云南省计划生育研究所  
潘汝能 云南省计划生育研究所  
彭林 云南省计划生育研究所  
吴大刚 中科院昆明植物研究所  
张宪民 中科院昆明植物研究所

组,每组 10 只,按寇氏法设计以 1.4 倍等比级数计算出 TH5 的 5 个给药试验剂量为 1.70、2.39、3.34、4.67 和 6.54g/kg。染毒前小鼠禁食约 8h,称重,用 1% 羧甲基纤维素钠(CMC)配制成浓度为 13.08%、9.34%、6.68%、4.78% 和 3.40% 的 TH5 悬液灌胃(0.5ml/10g)。观察记录动物中毒、死亡及尸检情况,存活动物继续饲养观察 7 天,记录同前。

### 三、Ames 试验

采用组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 TA97、TA98、TA100 及 TA102 为测试菌株。按标准平板掺入法,取 0.5、5、50、500、5000 $\mu$ g/皿并设空白(H<sub>2</sub>O 0.1ml/皿)、溶剂(DMSO 0.1ml/皿)及阳性(敌克松 50 $\mu$ g/皿)为对照。每皿菌量 0.1ml、顶琼脂 2.0ml,培养 48h。实验在加和不加微粒体酶(S<sub>9</sub>)条件下进行。测试动物的各种剂量均做 3 个平皿,取其均值及标准差,比较各剂量与对照间的回变菌落数及倍数反应。

### 四、染色体畸变试验

中国仓鼠肺细胞(CHL)由中科院上海细胞所提供。TH5 设 3 个试验剂量组:44 $\mu$ g/ml(IC<sub>50</sub>)、22 $\mu$ g/ml(1/2 IC<sub>50</sub>)和 11 $\mu$ g/ml(1/4 IC<sub>50</sub>),以二甲亚砜(DMSO)为溶剂对照,用多氯联苯为诱导剂处理后大鼠肝脏 S<sub>9</sub> 进行体外代谢活化,环磷酰胺(CP, 20 $\mu$ g/ml)为活化组阳性对照。染色体制备于代谢活化组在 TH5 与细胞接触 24h 收获,非活化组则于 TH5 与细胞接触 24h 及 48h 收获。每组镜检观察 100 个中期分裂细胞,比较各组 CHL 的染色体畸变率。

### 五、多染红细胞微核试验

应用动物为 ICR 封闭群小鼠,体重 20 $\pm$ 1g,雌雄各半,每组 10 只(由中英合资 BK 实验动物公司供应,生产合格证书号:沪医实动单第 66 号)。

TH5 设高、中、低 3 个试验剂量组:300mg/kg(ED<sub>50</sub> 之 2 000 倍)、150mg/kg(ED<sub>50</sub> 之 1 000 倍)和 30mg/kg(ED<sub>50</sub> 之 100 倍)。用 1.5% 甲基纤维素(MMC)制成混悬液并设 MMC 溶剂为对照,每鼠一次灌服 0.2ml。另设 CP(40mg/kg)为阳性对照,一次腹腔注射 0.2ml。给药 24h 后骨髓取样(预试验一次口服高剂量 TH5 后,分别在 24、48 及 72h 取样),每鼠镜检计数 1 000 个多染红细胞,比较各组间的微核发生率。

## 结 果

### 一、毒性试验

5 组灌服 TH5 染毒剂量的小鼠均出现活动减少、食欲减退、嗜睡的中毒症状。其中高剂量组小鼠 24h 内全部死亡,另 4 组小鼠在 7 天内有部分死亡(表 1)。解剖死亡小鼠心、肝、脾、肺、肾、胃肠、睾丸、子宫等脏器,未见瘀血、出血、溃烂等病变。存活动物继续饲养观察 7 天,发现以上症状反应逐渐消失,无一死亡。按加权回归计算 TH5 之 LD<sub>50</sub> 为 3.27g/kg,其 95% 可信区间为 2.76~3.87g/kg。

表 1 小鼠灌服 LD<sub>50</sub> 后的急毒观察结果

组别	剂量(g/kg)	动物数(只)	死亡数(只)	存活动物数(只)
1	1.70	10	0	10
2	2.39	10	3	7
3	3.34	10	5	5
4	4.67	10	8	2
5	6.54	10	10	0

### 二、Ames 试验

各剂量组的 TH5 对 TA97、TA98、TA100 及 TA102 的回变菌落数,在加和不加代谢活化系统条件下,均与其自发回变数相近,且未超过自发回变数 2 倍(表 2、表 3),故判为阴性。

表 2 TH5 对 TA97、TA98、TA100 及 TA102 的致突性

测试物 及剂量	回变菌落数(个/皿, $\bar{x} \pm s$ )								
	TA97		TA98		TA100		TA102		
	-S <sub>9</sub>	+S <sub>9</sub>	-S <sub>9</sub>	+S <sub>9</sub>	-S <sub>9</sub>	+S <sub>9</sub>	-S <sub>9</sub>	+S <sub>9</sub>	
TH5( $\mu$ g/皿)									
5 000	89 $\pm$ 12.2	100 $\pm$ 9.8	37 $\pm$ 16	41 $\pm$ 5.7	132 $\pm$ 27	128 $\pm$ 4.9	237 $\pm$ 8.2	251 $\pm$ 21.9	
500	121 $\pm$ 44	106 $\pm$ 7.5	45 $\pm$ 8.7	47 $\pm$ 5.1	131 $\pm$ 15.1	117 $\pm$ 316	246 $\pm$ 45	216 $\pm$ 12.7	
50	108 $\pm$ 7.3	124 $\pm$ 17.0	44 $\pm$ 10.6	35 $\pm$ 5.1	114 $\pm$ 19.3	125 $\pm$ 2.4	227 $\pm$ 34.7	259 $\pm$ 17.2	
5	110 $\pm$ 27	117 $\pm$ 38	33 $\pm$ 0.7	29 $\pm$ 3.5	123 $\pm$ 17.1	163 $\pm$ 17.1	219 $\pm$ 51	227 $\pm$ 3.6	
0.5	105 $\pm$ 22	111 $\pm$ 8.8	32 $\pm$ 3.6	39 $\pm$ 2.2	136 $\pm$ 9.1	140 $\pm$ 20	250 $\pm$ 7.3	227 $\pm$ 0.7	
DMSO	108 $\pm$ 5.6	111 $\pm$ 8.0	11 $\pm$ 7.1	37 $\pm$ 1.7	142 $\pm$ 1.4	124 $\pm$ 3.9	227 $\pm$ 24.5	228 $\pm$ 8.4	
双蒸水	110 $\pm$ 4.6	110 $\pm$ 2.6	34 $\pm$ 127	42 $\pm$ 5.6	129 $\pm$ 16.1	131 $\pm$ 4.7	240 $\pm$ 30	230 $\pm$ 3.7	
阳性对照	354 $\pm$ 81	455 $\pm$ 31	439 $\pm$ 77	286 $\pm$ 21	587 $\pm$ 29	691 $\pm$ 59	678 $\pm$ 171	671 $\pm$ 168	

\* 阳性物: -S<sub>9</sub>:TA97、TA98、TA100 及 TA102 均用敌克松(50 $\mu$ g/皿)  
+S<sub>9</sub>:TA97、TA98、TA100 用 2-AF(10 $\mu$ g/皿);TA102 用 1,8-二羟基蒽醌(30 $\mu$ g/皿)

表 3 Ames 试验 TH5 各剂量组、阳性对照组与阴性对照组回变菌落数相比的倍数

测试物及剂量 ( $\mu\text{g}/\text{皿}$ )	TA97		TA98		TA100		TA102	
	-S <sub>9</sub>	+S <sub>9</sub>	-S <sub>9</sub>	+S <sub>9</sub>	-S <sub>9</sub>	+S <sub>9</sub>	-S <sub>9</sub>	+S <sub>9</sub>
TH5								
5 000	0.84	0.91	0.90	1.11	0.93	0.97	1.04	1.09
500	1.12	0.98	1.09	1.09	0.92	0.94	1.08	0.95
50	1.00	1.12	1.07	1.07	0.81	1.00	1.22	1.13
5	1.02	1.05	0.85	0.85	0.87	1.31	0.96	0.99
0.5	0.97	1.00	0.78	0.78	0.97	1.13	1.10	0.99
阳性对照	3.82	4.10	12.9	6.81	4.55	5.27	2.80	2.92

三、TH5 的 CHL 染色体畸变试验

在最终浓度为 1/4 IC<sub>50</sub>、1/2 IC<sub>50</sub> 及 IC<sub>50</sub> 时无论加 S<sub>9</sub> 与否,CHL 染色体畸变率与溶剂对照组相比差异均无统计学意义(表 4),测试结果判为阴性。

四、多染红细胞微核试验

小鼠骨髓多染红细胞微核试验结果表明,TH5 各剂量组之微核率与阴性对照组相比,差异也均无统计学意义(表 5),呈阴性结果。

表 4 TH5 的 CHL 染色体畸变试验

组别	S <sub>9</sub>	时间(h)	细胞数(个)	畸变类型								畸变细胞(个)	畸变率(%)
				断裂	单断	三辐体	四辐体	环	碎片	双着丝点	多倍体		
溶剂对照	-	24	100	3	0	0	0	0	0	0	0	3	3
MMC(阳性)	-	24	100	12	2	1	1	1	1	0	0	18	18
TH5													
44 $\mu\text{g}/\text{ml}$	-	24	100	2	0	0	0	0	0	0	1	4	4
22 $\mu\text{g}/\text{ml}$	-	24	100	3	0	0	0	0	0	0	0	3	3
11 $\mu\text{g}/\text{ml}$	-	24	100	1	0	0	1	0	0	0	0	2	2
溶剂对照	-	48	100	2	0	0	0	0	0	0	1	3	3
MMC(阳性)	-	48	100	14	1	2	2	2	0	0	0	21	21
TH5													
44 $\mu\text{g}/\text{ml}$	-	48	100	3	1	0	0	0	0	0	1	5	5
22 $\mu\text{g}/\text{ml}$	-	48	100	1	0	0	0	0	0	1		2	2
11 $\mu\text{g}/\text{ml}$	-	48	100	1	0	0	0	0	0	0	1	2	2
溶剂对照	+	24	100	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
MMC(阳性)	+	24	100	8	4	10	6	0	0	0	0	28	28
TH5													
44 $\mu\text{g}/\text{ml}$	+	24	100	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
22 $\mu\text{g}/\text{ml}$	+	24	100	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
11 $\mu\text{g}/\text{ml}$	+	24	100	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2

表 5 TH5 对小鼠骨髓多染红细胞微核试验

组别	动物数	动物体重(g)	观察细胞数	微核率( $\bar{x} \pm s$ )	多染红细胞与正染红细胞之比率( $\bar{x} \pm s$ )
阳性对照	10	19 $\pm$ 1.6	8 000	13.75 $\pm$ 2.76	0.68 $\pm$ 1.14
阴性对照	10	20 $\pm$ 0.5	10 000	2.5 $\pm$ 1.90	1.18 $\pm$ 2.12
高剂量(300mg/kg)	10	20 $\pm$ 1.0	10 000	2.9 $\pm$ 1.44	1.09 $\pm$ 1.86
中剂量(150mg/kg)	10	19 $\pm$ 1.8	10 000	2.2 $\pm$ 1.22	1.16 $\pm$ 3.01
低剂量(30mg/kg)	10	20 $\pm$ 1.0	10 000	2.4 $\pm$ 1.17	1.18 $\pm$ 2.24

讨论

昆明山海棠为卫矛科雷公藤属植物,与雷公藤虽同属但不同种。有关雷公藤与昆明山海棠提取物对大、小白鼠及育龄男性的抗生育作用,自上世纪 70 年代以来已多有报道。然而,由于有研究称其中的某些提取物也表现出了令人担心的毒副作用,特别是在小

鼠骨髓细胞中的有丝分裂阻滞、染色体异常分离及姐妹染色体单体互换(SCE)诱发效应<sup>[2]</sup>,以及对人精子染色体具有致断作用<sup>[3]</sup>等,引起了人们的关注,几乎成为进一步研究难以逾越的障碍。因此,笔者就昆明山海棠雄性抗生育活性提取物 TH5 于上世纪末完成的毒性检测结果,予以初步评价。

本文检测结果表明:TH5 之 LD<sub>50</sub> 为 3.27g/kg,是其抗生育有效剂量 0.116mg/kg 的 28.36 倍;TH5 对鼠伤寒沙门氏菌无致突性;TH5 对 CHL 细胞染色体畸变试验及小鼠骨髓多染红细胞微核试验均未显示出遗传毒性,证明具有一定的安全性。笔者据此对昆明山海棠雄性抗生育活性提取物 TH5 的潜在发展前景持乐观态度。

本文检测结果与他人对昆明山海棠的毒性评价不一致,究其根本原因,在于彼此测试的昆明山海棠提取物完全不同。如前述汪旭与马福明等<sup>[3,4]</sup>测试的是昆明山海棠的水提取物,而笔者所用则为其乙醇提取物且经去除生物碱后,再以溶剂及硅胶柱层析法划分为若干部分所得之一物质。前者所得均为粗提物,而后者所得相较水提取物而言,其组分已介于粗提物与单体化合物之间<sup>[4]</sup>,且因有意识地将其中不宜用于男性避孕的生物碱类“杂质”予以去除,使得 TH5 的毒副作用明显减弱<sup>[5,6]</sup>。无庸而言昆明山海棠提取物的成份不同,其活性表现与毒副作用肯

定也不尽相同。综上所述,笔者认为,对昆明山海棠的遗传毒性或免疫抑制活性等的检测结果进行评价,应当对提取物作具体分析,切忌一概而论。当前,如能对昆明山海棠提取物 TH5 等成份的化学、药理学及遗传毒理学等进行深入验证,也许将有助于打破多年来中药男性避孕药研究的僵局。

(致谢:昆明医学院云南省天然药物药理重点实验室:陆瑛、杨荣;中国生育调节药物毒理检测中心:丁训诚,丁亦诺,沈卫英)

#### 参考文献

- 1 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(一部). 北京:化学工业出版社,2000,494.
- 2 周激文,周争立,李文琦. 昆明山海棠提取物的活性研究及其成份分析. 中国中医药信息杂志,2002,5:44.
- 3 汪旭,合正基,刘素清. 5-溴脱氧尿嘧啶核苷标记法检测哺乳动物细胞染色体异常分离的研究. 癌变·畸变·突变,1994,4:1.
- 4 马福明,蔡敏,李练兵,等. 昆明山海棠对人精子染色体的诱变作用研究. 癌变·畸变·突变,2000,2:90.
- 5 李晓玉,周激文,张宪民,等. 昆明山海棠提取的 TH5 对小鼠免疫功能的影响. 云南医药,1998,4:242.
- 6 周激文,李文琦,潘汝能,等. 昆明山海棠抗生育活性提取物 TH5 对雄性大鼠性行为与血清性激素水平影响观察. 中国男科学杂志,1999,4:211.

(上接 525 页) 为了面对国际市场,必须解决安全套的质量问题,以达到国际普遍接受的世界卫生组织标准(至少达到目前的 ISO 标准)。通过帮助国家计生委药具发展中心加强与生产厂家在这方面的合作,联合国人口基金和其伙伴组织将能够帮助中国全面提高其国产安全套的质量,这将不仅对国内市场安全套的质量产生影响而且能够提高中国厂商参与国际竞争的能力。该子项目开展的活动包括:帮助重要私营企业制订业务计划、为厂家和供应商组织研讨会,以及邀请

并资助专家提供咨询服务。

上述活动开展的结果将能够全面提高中国市场上销售的安全套的质量。其结果能够帮助安全套使用者避免避孕失败(避孕失败是终止妊娠的主要原因),并防止感染艾滋病病毒/艾滋病。不仅如此,如果中国生产厂商能够生产质量达到国际标准的安全套,并成功打入国际市场,那么国际市场安全套的价格也许会下降,使人们能够获得价格上支付得起的优质避孕药具,这利于发展中国家的育龄人口。 (待续)

## 全国不孕、不育症新技术、新进展培训班报名通知

由世界卫生组织人类生殖研究合作中心/上海市计划生育科学研究所/《生殖与避孕》杂志和北京孙逊医学研究院联合主办的“全国不孕、不育症新技术、新进展培训班”,定于 2003 年 10 月 9~16 日在杭州市举行。

大会将邀请江鱼教授主讲男性不育进展;石一复教授主讲女性不孕不育诊断与治疗;朱嘉铭主任医师主讲性爱对孕育成败的影响;妇科(不孕症)诊断治疗仪发明人孙逊教授主讲妇科(不孕症)诊断治疗仪的临床应用价值、宫腔容积正常值计算系统及其重要意义。幼稚型子宫及先天性子宫单系畸形 118 种不孕不育症诊断技术。培训班还将介绍新一代的用于妇女子宫内腹病理学检查及月经紊乱等手术治疗,亦可用于抗早孕术的妇科诊刮器,宫腔组织吸引器。现将报名有关事宜通知如下:

一、本次培训班学费 800 元,食宿由大会统一安排(100 元/人/天,食宿费用自理)。10 月 9 日报到,报到地点:杭州市山水宾馆(教工路 187 号,文一路口),电话:0571-88838287\*1616。报到当日火车站有专车接站。

二、报名截止日期:2003 年 9 月 30 日,并预交订床费 100 元,否则恕不接待。

三、报名通讯地址:

1. 《生殖与避孕》编辑部:上海市斜土路 2140 号 邮编 200032 电话/传真:021-64184195 <http://www.RepaCon.com>  
E-mail:randc@sippr.stc.sh.cn reproduction.journal@hotmail.com

2. 北京孙逊医学研究院:北京市大慧寺路 12 号信息楼 邮编 100081 电话:010-62599653 联系人:白永莉

北京孙逊医学研究院