

· 论 著 ·

某中药育发液外用的毒理学研究

孟真, 郑云燕, 严峻, 傅剑云, 朱周靓, 张世鑫, 周忬

浙江省疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310051

摘要: **目的** 评估某中药育发液外用的安全性。**方法** 采用急性眼刺激试验检测中药育发液的眼刺激性; 采用皮肤刺激试验、皮肤变态反应试验和皮肤光毒性试验检测中药育发液的皮肤毒性; 采用鼠伤寒沙门菌回复突变试验 (Ames 试验) 和 CHL 细胞染色体畸变试验检测中药育发液对原核细胞和真核细胞遗传物质的诱变性。**结果** 急性眼刺激试验结果显示, 家兔眼部涂抹育发液原液后, 结膜表现为充血和水肿, 最高积分为 2 (24 h); 角膜混浊, 最高积分为 1 (24 h); 眼部症状 72 h 内恢复正常, 积分降至 0。育发液对家兔的多次皮肤刺激试验结果为无刺激性; 对豚鼠皮肤的致敏率为 0; 对豚鼠皮肤无光毒性作用。在添加和未添加代谢活化系统条件下, 与阴性对照组相比, 育发液各剂量组鼠伤寒沙门菌回变菌落数均未出现异常增多, 均未引起 CHL 细胞染色体畸变率增加 ($P > 0.05$)。**结论** 在本实验条件下未观察到该中药育发液的皮肤毒性和遗传毒性, 对眼有轻度刺激性但作用可逆, 因此其外用安全性可以接受。

关键词: 中药育发液; 安全性; 眼刺激性; 皮肤毒性; 遗传毒性

中图分类号: R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-5087 (2019) 05-0465-06

A toxicological study of a herbal pilatory for external use

MENG Zhen, ZHENG Yun-yan, YAN Jun, FU Jian-yun, ZHU Zhou-jing, ZHANG Shi-xin, ZHOU Bian

Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang 310051, China

Abstract: **Objective** To evaluate the safety of a herbal pilatory for external use. **Methods** An acute eye irritation test were employed to detect the eye irritation of the herbal pilatory; a skin irritation test, a skin sensitization test and a skin phototoxicity test were employed to detect the dermal toxicity; *Salmonella typhimurium* reverse mutation assay (Ames test) and chromosome aberration test in CHL cells were employed to detect the effects of the pilatory on gene mutation and chromosome aberration in prokaryotic and eukaryotic cells. **Results** When the eyes of rabbits exposed to the pilatory without rinse during the first 24 hours, the conjunctiva showed congestion and edema with the highest score of 2, corneal opacity was observed with the highest score of 1; however, these symptoms returned to normal within 72 hours, with the score reduced to 0. No irritation to the skin of rabbits was found after exposed to the pilatory for fourteen days, no skin sensitization was introduced by Buehler test and no skin phototoxicity on guinea pigs was detected. There was no abnormal growth of reverse mutation colonies induced by the pilatory under S_0 activation or not. There was no statistically significant rise of chromosome aberration rate in the exposed CHL cells compared to the control groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Under the condition, the herbal pilatory showed mild and reversible irritation to eyes, while no dermal toxicity and genetic toxicity were observed. The safety of the herbal pilatory for external use is acceptable.

Key words: Herbal pilatory; Safety; Eye irritation; Dermal toxicity; Genetic toxicity

育发液是指有助于毛发生长、减少脱发和断发的特殊用途化妆品^[1]。目前市场上销售的育发类产品多以中药成分为主, 如何首乌根、骨碎补等。现代动物实验研究证明外用何首乌根提取物可促进C57BL/6J小鼠毛发由休止期进入生长期, 提高毛发皮肤覆盖率

和生发因子表达量^[2-3]。口服何首乌根能明显促进小鼠毛发中黑色素含量增加^[4]。骨碎补以根茎入药, 多用于骨损伤修复^[5-6], 外用也可明显增加斑秃模型组小鼠的毛囊数量^[7]。但近年有研究表明何首乌根的某些药理活性成分可引起药物性肝损伤^[8-9]和过敏反应^[10], 因此育发类产品的安全性不容忽视。本研究结合动物实验和体外试验, 从毒理学角度考察某中药育发液对眼、皮肤的刺激性和毒性及潜在的遗传

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2019.05.008

作者简介: 孟真, 博士, 副主任技师, 主要从事毒理学检测工作

通信作者: 郑云燕, E-mail: yzhen@cdc.zj.cn

毒性,以评估该中药育发液的安全性,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受试物 某中药育发液,棕黄色液体,密封避光包装,由金华市某化妆品公司生产,主要成分为侧柏叶、何首乌根和海州骨碎补,使用方法为每日3~4次搽于脱发处,用手轻轻按摩。

1.1.2 实验动物 实验用白色家兔(体重2.2~2.5 kg)由新昌县大市聚镇欣健兔场提供,实验动物生产许可证号:SCXK(浙)2015-0004。实验用豚鼠(体重250~350 g)由无锡市惠山江南实验动物场提供,实验动物生产许可证号:SCXK(苏)2015-0004。动物饲料由浙江省实验动物中心提供,执行GB 14924.1—2001《实验动物 配合饲料通用质量标准》。实验动物使用许可证号:SYXK(浙)2013-0190。饲养环境:普通环境,温度20~23℃,相对湿度40%~70%。实验动物在动物房环境中适应3~5 d后进行试验。

1.1.3 菌株 鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*)组氨酸营养缺陷型菌株TA₉₇、TA₉₈、TA₁₀₀和TA₁₀₂为本实验室保存;his⁻、 Δ uvrB、rfa、R因子、PAQI质粒和自发回变6项生物性状经鉴定合格,用于体外试验。

1.1.4 细胞株 中国仓鼠肺细胞株CHL购于中科院典型培养物保藏中心,用于体外试验。

1.1.5 代谢活化剂S₉ 清洁级SD雄性大鼠(体重约200 g)经腹腔1次注射多氯联苯混合液(500 mg/kgbw)诱导5 d后,取肝脏,冰浴快速匀浆后,4℃,9 000 r/min离心10 min,收集上清液即为S₉。经Lowry法测定蛋白含量,调整至20 mg/mL,并经2-AF和1,8-二羟基蒽醌鉴定后分装,-80℃保存,用于体外试验。

1.1.6 主要试剂和仪器 RPM1640培养液、胎牛血清、胰蛋白酶(美国Hyclone公司);6-磷酸葡萄糖二钠、辅酶II(上海伯奥生物科技有限公司);2,4-二硝基氯苯(上海国药集团);丙酮(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司)。Ames试验阳性物质:环磷酰胺、2-AF、1,8-二羟基蒽醌、ICR-191、8-MOP(美国Sigma Aldrich公司);柔毛霉素(浙江大学附属第二医院惠赠);丝裂霉素C(浙江海正药业);NaN₃(上海化学试剂厂)。仪器:日光紫外线模拟器UV-1000(上海西格玛,紫外线发射源为1 000 W氙灯,可发射波长为320~400 nm的UVA);光学显微

镜DM1000(德国徕卡)。

1.2 动物实验

1.2.1 急性眼刺激性试验 选用3只健康且眼部正常的白色家兔,取受试物0.1 mL滴入一侧眼结膜囊,上下眼睑被动闭合1 s,24 h内不冲洗眼部,另一侧眼作自身对照。观察记录滴眼后1 h、24 h、48 h、72 h和第4~7 d家兔眼部反应,根据结膜、角膜和虹膜的最高积分和恢复时间判定眼刺激强度。

1.2.2 多次皮肤刺激性试验 选用4只健康且皮肤完好的白色家兔,试验前24 h在背部脊柱两侧剪毛各一块,面积为3.0 cm×3.0 cm。取受试物0.5 mL涂于一侧除毛区域,另一侧作对照,每天涂1次,连续14 d。每次涂皮前修毛,并用温水清除残留受试物,清洗后1 h观察记录皮肤水肿和红斑的分值,根据每天每只动物积分均值判定皮肤刺激强度。

1.2.3 皮肤变态反应试验 选用50只健康且皮肤完好的豚鼠,按随机数字表法分成受试物组、阴性对照组和阳性对照组。采用局部封闭法,分诱导和激发2个阶段。试验前24 h豚鼠背部一侧去毛,面积为2.5 cm×2.5 cm。诱导阶段阴性对照组不作处理,受试物组和阳性对照组分别取受试物和0.4% 2,4-二硝基氯苯丙酮麻油溶液0.2 mL涂抹于除毛区域,以纱布和玻璃纸覆盖并用无刺激胶布封闭固定6 h,去除覆盖物,用温水洗去残留物,观察记录局部反应。第7 d和第14 d以同样方法重复1次。末次诱导后第14 d,将0.2 mL受试物涂抹于受试物组和阴性对照组动物背部另一侧除毛区,封闭固定6 h,作激发处理。阳性对照组用0.2% 2,4-二硝基氯苯丙酮麻油溶液0.2 mL作同样的激发接触。观察记录激发接触后24 h和48 h豚鼠皮肤反应,根据皮肤反应分值之和 ≥ 2 的豚鼠数占豚鼠总数的比例判定皮肤致敏强度。

1.2.4 皮肤光毒性试验 选用12只健康且皮肤完好的豚鼠,分成受试物组和阳性对照组。试验前24 h将豚鼠背部脊柱两侧去毛,准备4块区域,每块面积约2 cm×2 cm。在上部2块除毛区域(1号和2号)涂抹0.2 mL受试物或阳性对照物0.4% 8-MOP。30 min后,左侧(1号和3号区域)用铝箔覆盖并用胶带固定,右侧(2号和4号区域)用长波紫外线(UVA)照射一定时间(经测定光强度后计算光照时间)。观察记录1、24、48、72 h后豚鼠皮肤反应,当涂受试物且未经UVA照射的1号区域未出现反应,而涂受试物且经UVA照射的2号区域出现反应分值之和 ≥ 2 的豚鼠数 ≥ 1 只时,判为具有光毒性。

1.3 体外试验

1.3.1 鼠伤寒沙门菌回复突变试验 (Ames 试验)

选用 TA₉₇、TA₉₈、TA₁₀₀、TA₁₀₂ 菌株, 终浓度为 10% 的 S₉ 作为体外代谢活化系统。采用平板掺入法, 受试物设 5 个剂量组 (以育发液原液作为最高剂量: 88 mg/ 皿)。分别在加和不加 S₉ 条件下进行, 每组设 3 皿平行, 37 °C 恒温培养 48 h 后, 计数每皿的回变菌落数。同时设空白对照组、溶剂 (水) 对照组和阳性对照组 (ICR-191、柔毛霉素、NaN₃、丝裂霉素 C、2-AF、1, 8- 二羟基蒽醌)。试验进行 2 次。受试物组的回变菌落数是溶剂对照组的 2 倍或以上且呈剂量-反应关系, 或受试物任一剂量组的回变菌落数是溶剂对照组的 2 倍或以上且有可重复性, 均可判为试验阳性。无论是否添加 S₉, 受试物组只要有一个试验菌株出现阳性结果, 即为致突变阳性。

1.3.2 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验

选择 CHL 细胞为试验对象, 终浓度为 10% 的 S₉ 作为体外代谢活化系统。受试物设 3 个剂量组, 同时设阴性对照组和阳性对照组 (丝裂霉素 C、环磷酰胺), 分别在加和不加 S₉ 条件下进行, 并重复 1 次。CHL 细胞接种于细胞瓶中, 37 °C, 5%CO₂ 培养 24 h 后, 加入受试物染毒 5 h, 继续培养细胞 24 h 后收获, 收获前 4 h 加入终浓度为 1 μg/mL 的秋水仙素处理细胞。低渗, 制片并经吉姆萨染色, 油镜下 (15 × 100 倍) 观察 100 个细胞, 记录染色体畸变类型和数量, 计算染色体畸变细胞率。受试物组的畸变细胞率较阴性对照组增加 (差异有统计学意义) 并呈剂量 - 反应关系, 或某一剂量组的畸变细胞率增加 (差异有统计学意义) 并有可重复性, 判为试验阳性。

1.4 统计分析

采用 Excel 2010 软件录入和整理数据, 采用 SPSS 15.0 软件统计分析。各实验组染色体畸变率的比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 眼刺激性

家兔眼部涂抹育发液原液后, 结膜表现为充血和水肿, 最高积分为 2 (24 h); 角膜混浊, 最高积分为 1 (24 h); 虹膜为 0。结膜和角膜在 72 h 内恢复正常, 积分降至 0, 不再进行第 4 ~ 7 d 的观察。见表 1。

表 1 某中药育发液家兔急性眼刺激性试验结果

家兔 编号	观察 部位	眼刺激反应积分							
		1 h		24 h		48 h		72 h	
		试验	对照	试验	对照	试验	对照	试验	对照
1	结膜	1	0	2	0	1	0	0	0
	虹膜	0	0	0	0	0	0	0	0
	角膜	0	0	1	0	0	0	0	0
2	结膜	1	0	2	0	1	0	0	0
	虹膜	0	0	0	0	0	0	0	0
	角膜	0	0	1	0	0	0	0	0
3	结膜	1	0	2	0	1	0	0	0
	虹膜	0	0	0	0	0	0	0	0
	角膜	0	0	0	0	0	0	0	0
积分 均值	结膜	1.0	0	2.0	0	1.0	0	0	0
	虹膜	0	0	0	0	0	0	0	0
	角膜	0	0	0.7	0	0	0	0	0

2.2 皮肤毒性

2.2.1 多次皮肤刺激性试验结果

连续涂抹育发液原液 14 d, 每日观察, 4 只家兔皮肤均未出现红斑和水肿, 每天每只动物积分均值为 0。

2.2.2 皮肤变态反应试验结果

经育发液原液 3 次诱导接触后, 试验组豚鼠皮肤均未出现红斑和水肿。在原液激发接触后 24 h 和 48 h, 试验组豚鼠皮肤也均未出现红斑和水肿, 致敏率为 0; 阳性对照组的致敏率分别为 40.0% 和 55.0%。见表 2。

表 2 某中药育发液豚鼠皮肤变态反应试验结果

组别	观察 时间 (h)	出现皮肤反应的豚鼠数									致敏率 (%)
		红斑反应强度					水肿反应强度				
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	
阴性对照组 (n=10)	24	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	48	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
受试物组 (n=20)	24	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0
	48	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0
阳性对照组 (n=20)	24	6	7	7	0	0	12	8	0	0	40.0
	48	12	8	0	0	0	7	8	5	0	55.0

2.2.3 皮肤光毒性试验结果 试验组豚鼠 1 号区域未出现皮肤反应，即育发液原液未引起原发刺激；2 号区域经 UVA 照射 171 s（经辐射计量仪测定豚鼠背

部 6 个测试点的光强度均值为 58.6 mW/cm²），也未观察到红斑和水肿，分值为 0。阳性对照组 2 号区域皮肤均有不同程度的红斑和水肿。见表 3。

表 3 某中药育发液豚鼠光毒性试验结果

组别	豚鼠 编号	性 别	皮肤反应积分															
			1 h				24 h				48 h				72 h			
			1 ^a	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
受试物组	1	雄	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	雄	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	雄	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	雌	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	雌	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	雌	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
阳性对照组	1	雄	0	0	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0
	2	雄	0	0	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0
	3	雄	0	0	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0
	4	雌	0	0	0	0	0	3	0	0	0	4	0	0	0	3	0	0
	5	雌	0	0	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0
	6	雌	0	0	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0

注：a 表示豚鼠背部皮肤 4 个试验区域的编号。

2.3 遗传毒性

2.3.1 Ames 试验结果 在加和不加 S₀ 条件下，4 个测试菌株对应的阳性对照组试验结果均呈阳性，

Ames 试验成立。受试物各剂量组的各个测试菌株的回变菌落数均在正常范围内，均未超过溶剂对照组的 2 倍，结果为阴性。见表 4。

表 4 某中药育发液 Ames 试验结果

组别	剂量 (mg/ 皿)	回变菌落数 ($\bar{x} \pm s$)							
		TA ₉₇		TA ₉₈		TA ₁₀₀		TA ₁₀₂	
		-S ₀	+S ₀	-S ₀	+S ₀	-S ₀	+S ₀	-S ₀	+S ₀
受试物组	0.344	134 ± 3	134 ± 4	34 ± 1	34 ± 2	129 ± 4	133 ± 5	256 ± 7	264 ± 7
	1.375	132 ± 3	137 ± 3	34 ± 1	35 ± 1	132 ± 4	135 ± 3	255 ± 6	269 ± 4
	5.5	136 ± 3	144 ± 6	35 ± 2	36 ± 3	137 ± 3	139 ± 7	262 ± 4	280 ± 15
	22	141 ± 4	147 ± 8	35 ± 3	37 ± 2	143 ± 6	152 ± 7	276 ± 9	288 ± 5
	88	147 ± 7	158 ± 3	36 ± 3	40 ± 2	153 ± 4	158 ± 9	285 ± 5	301 ± 6
空白对照组		130 ± 3	138 ± 7	35 ± 2	36 ± 1	138 ± 6	142 ± 2	279 ± 5	274 ± 8
溶剂对照组(H ₂ O)		132 ± 4	134 ± 6	36 ± 3	35 ± 3	139 ± 1	141 ± 7	275 ± 8	282 ± 4
ICR-191	1.0	1 185 ± 171							
柔毛霉素	6.0	1 159 ± 190							
NaN ₃	1.5	1 243 ± 202							
丝裂霉素 C	0.5	1 281 ± 252							
2-AF	10	1 330 ± 237		1 239 ± 258		1 170 ± 175			
1, 8- 二羟基蒽醌	50	1 193 ± 96							

2.3.2 CHL 细胞染色体畸变试验结果 受试物 5 000、2 500、1 250 μg/mL 3 个剂量组不加 S₀ 条件

下细胞有丝分裂率分别为 62.5%、93.1%和 96.7%；加 S₀ 条件下分别为 56.8%、65.7%和 83.4%。在加和

不加 S₀ 条件下, 受试物组 CHL 细胞染色体畸变率与阴性对照组比较, 差异均无统计学意义 (Fisher 确切概率法, $P=0.758, 0.999$); 不加 S₀ 条件下, 阳性对照组 (丝裂霉素 C) CHL 细胞染色体畸变率较阴性对

照组增加, 差异有统计学意义 ($\chi^2=33.918, P < 0.001$); 加 S₀ 条件下, 阳性对照组 (环磷酰胺) CHL 细胞染色体畸变率较阴性对照组增加, 差异有统计学意义 ($\chi^2=15.376, P < 0.001$)。见表 5。

表 5 某中药育发液 CHL 细胞染色体畸变试验结果

组别	终浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	+S ₀			-S ₀		
		观察细胞数	畸变细胞数	畸变率 (%)	观察细胞数	畸变细胞数	畸变率 (%)
阴性对照组		100	2	2.0	100	0	0
受试物组	1 250	100	3	3.0	100	0	0
	2 500	100	5	5.0	100	1	1.0
	5 000	100	3	3.0	100	1	1.0
丝裂霉素 C	2				100	29	29.0
环磷酰胺	20	100	19	19.0			

3 讨论

本研究所用的中药育发液的主要成分是何首乌根、骨碎补和侧柏叶。除了何首乌根和骨碎补, 侧柏叶也是皮肤科临床应用较广的一种药材, 多与骨碎补、何首乌和丹参等药材配伍后, 外用或配合内服治疗斑秃和雄激素源性脱发^[11]。尽管这些中药材是符合国家规定的化妆品原料^[12], 但是按照一定比例配伍, 并以一定工艺加工形成的育发产品的安全性是未知的。

根据《化妆品安全技术规范》(2015) 的评判标准, 该育发液原液的急性眼刺激强度属轻刺激性, 但该刺激性是可逆的, 即在涂抹该育发液后 24 小时内, 尽管兔眼的角膜和结膜有局部损伤, 但 72 小时内均恢复正常。这可能与该育发液中含有乙醇等溶剂有关, 提示该育发液在使用过程中如不慎入眼, 需及时用干净的水冲洗。在皮肤毒性测试中, 兔皮肤经 14 天连续涂抹育发液, 均未观察到皮肤红斑和水肿, 多次皮肤刺激强度属无刺激性; 采用局部封闭法, 该育发液对豚鼠皮肤无致敏作用; 经模拟日光照射, 未观察到该育发液对豚鼠有皮肤光毒性作用: 提示多次使用该育发液不会引起皮肤刺激性和致敏性, 无皮肤光毒性。本研究观察到的动物实验结果与易资梅等^[13]报道的以何首乌根提取物为主要成分的防脱发精华露的结果相似。

在添加和不添加代谢活化系统条件下, 包括育发液原液在内的各剂量组均未引起鼠伤寒沙门菌回复突变的异常增加, 提示在该原核生物体外诱变检测系统中, 未检测到该育发液的致突变作用。在 CHL 细胞染色体畸变试验中, 高浓度育发液对细胞活力和细胞

分裂有影响, 当剂量为 10 000 $\mu\text{g/mL}$ 时, 不论是否添加活化系统, CHL 细胞在染毒 5 小时后基本丧失贴壁能力, 成片脱落, 几乎无法进行后续细胞收集。当剂量为 7 500 $\mu\text{g/mL}$ 时, 虽有部分细胞可被收集制片, 但在添加和不添加代谢活化系统条件下的有丝分裂率分别为 28.1% 和 37.8%, 均远低于 50%。依据最高剂量设置原则, 选择有丝分裂能力受抑制程度约为 50% 时的剂量 5 000 $\mu\text{g/mL}$ 为最高剂量。尽管试验对剂量设置有一定限制, 但考虑育发液为外用, 5 000 $\mu\text{g/mL}$ 剂量条件下的试验结果是可以被采纳的, 提示在真核生物体外诱变检测系统中未检测到中药育发液致染色体畸变作用。另外, 试验中同一剂量下, 不加 S₀ 的细胞生长状态较加 S₀ 的细胞略好, 中期分裂相更多, 提示育发液中某些物质经活化代谢后对细胞的毒性作用可能较该物质本身更大, 但与染发剂在不加代谢活化系统条件下毒性较大的现象恰好相反。

综上所述, 该中药育发液对眼有轻刺激性, 对皮肤无刺激性、无致敏性、无光毒性作用, 致突变试验结果均为阴性, 说明这种中药育发液外用的安全性是可以接受的, 但需防止液体意外进入眼睛。

参考文献

- [1] 国家药品监督管理局. 什么是特殊用途化妆品 [EB/OL]. (2017-10-25)[2019-01-08]. <http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2160/319524.html>.
- [2] 何红梅, 朱红霞, 刘强, 等. 何首乌提取物对 C57BL/6J 小鼠毛囊生长和毛发生长周期的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (23): 216-219.