

# Ames 试验与 MLA 试验检测两味含马兜铃酸中药的致突变性

# Detection of Mutagenicity of Two Chinese Medicines Containing Fructus Aritolochiae by Ames Test and Mouse Lymphoma Assay

陆 华<sup>1</sup>/马康目<sup>2</sup>/孙 皎<sup>1</sup>/陈 灵<sup>2</sup>

(1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院, 上海生物材料研究测试中心 200023;

2. 上海交通大学生命技术学院, 上海)

LU Hua<sup>1</sup>, MA Kang-mu<sup>2</sup>, SUN Jiao<sup>1</sup>, CHEN Ling<sup>2</sup>

(1. Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200023; 2. School of Life Science and Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200023, China)

**【摘要】**背景与目的: 检测单味马兜铃及复方龙胆泻肝丸的遗传毒性。材料与方法: 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验 (Ames test) 检测含马兜铃酸的两味单、复方中药的细菌回复突变率; 采用 96 孔微孔板接种法进行小鼠淋巴瘤细胞 *tk* 基因突变试验 (mouse lymphoma assay, MLA), 经单、复方含马兜铃酸浓度 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  对 L5178Y/*tk*<sup>(+/-)</sup>-3.7.2c 细胞进行染毒, 分别测定其接种效率 (PE), 相对总增长率 (RTG) 和突变频率 (MF)。结果: Ames 试验结果为阴性, 而小鼠淋巴瘤试验显示单味马兜铃具有一定细胞毒性并诱导 *tk* 基因突变, 产生突变集落; 而复方龙胆泻肝丸未诱发 *tk* 基因突变。结论: 受试的单味马兜铃具有一定的遗传毒而复方龙胆泻肝丸具有对马兜铃的减毒效应。

**【关键词】**马兜铃酸; Ames 试验; 小鼠淋巴瘤细胞试验; *tk* 基因突变 遗传毒理

中图分类号: R282.71; Q754

文章标识码: A

文章编号: 1004-616X(2007)06-0484-03

**【ABSTRACT】** BACKGROUND & AIM: To study the mutagenicity of Fructus Aristolochiae (FA) alone and compounded with Long Dan Xie Gan Wan (LDXGW) using Ames test and mouse lymphoma assay. MATERIALS AND METHODS: Ames test was conducted to determine whether FA and LDXGW, which contained AA at the concentration of 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , would cause mutagenic changes in the average number of revertants for TA<sub>97</sub>, TA<sub>98</sub>, TA<sub>100</sub> and TA<sub>102</sub>. L5178Y/*tk*<sup>(+/-)</sup>-3.7.2C-cells were treated with FA and LDXGE at a concentration of 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  by the 96-well microwell method. The plating efficiency (PE), relative total growth (RTG) and the mutant frequency (MF) were determined by the microtiter procedure. RESELTs: FA and LDXGE were considered to be nonmutagenic to Salmonella typhimurium tester strains TA<sub>97</sub>, TA<sub>98</sub>, TA<sub>100</sub> and TA<sub>102</sub> in Ames test. FA was characterized by marked cytotoxicity and mutagenic activity. However LDXGW showed that cytotoxicity and mutagenic activity were largely reduced when made into a compound. CONCLUSION: FA had certain cytotoxicity and mutagenicity while LDXGE could reduce the mutation of *tk* gene.

**【KEY WORDS】** Fructus Aristolochiae; Ames test; mouse lymphoma assay; *tk* gene mutation; mutagenicity

随着中国传统中药进入国际市场, 中药的全球化面临着机遇和考验。马兜铃酸中药引起的中草药肾病 (CHN) 目前已受到广泛关注, 其体内的药理毒性已经有了广泛的研究<sup>[1-2]</sup>, 但如何在临床应用前进行快速、有效的生物学评价就显得尤为重要。本实验旨在通过传统的 Ames 试验和小鼠淋巴瘤细胞 *tk* 基因突变试验

(mouse lymphoma assay, MLA), 对单味马兜铃和复方龙胆泻肝丸 (含马兜铃) 的遗传毒性进行测试和评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 受试物 设计 3 种受试物, 马兜铃酸标准

收稿日期: 2006-10-08; 修改日期: 2007-06-18

基金项目: 上海市重点学科 (特色学科) 建设项目资助 (T0202)

作者简介: 陆 华 (1972-), 女, 上海市人, 学士, 助理研究员, 研究方向: 遗传毒理学。

品,单味马兜铃,复方龙胆泻肝丸,马兜铃酸为脂溶性物质,极易溶解于 DMSO 而难溶于水,同时设溶剂对照组(DMSO 5 μg/ml)及阳性对照组:Ames 试验中阳性物选择如下:不加 S<sub>9</sub> 的情况下,TA<sub>100</sub> 和 TA<sub>102</sub> 选用甲基磺酸甲酯(methylmethansulfonate, MMS),TA<sub>97</sub> 选用阿的平,TA<sub>98</sub> 选用对硝基喹啉;在加 S<sub>9</sub> 的情况下,TA<sub>97</sub>, TA<sub>98</sub> 和 TA<sub>100</sub> 选用 2-氨基芴,TA<sub>102</sub> 选用 1,8-二羟基蒽醌。MLA 试验中阳性材料选用 MMS。

**1.1.2 试验菌株及细胞株** TA<sub>97</sub>, TA<sub>98</sub>, TA<sub>100</sub>, TA<sub>102</sub> 由复旦大学公共卫生学院提供,生物学性状符合菌株要求,置于 4℃ 冰箱待用。小鼠淋巴瘤 L5178Y tk<sup>(+/-)</sup>-3.7.2 c<sup>-</sup> 细胞由上海国家新药安全评价研究中心遗传毒理室提供。细胞呈淋巴瘤母细胞样,悬浮生长,用含有体积分数为 10% 的马血清以及青霉素、链霉素、丙酮酸钠的 RPMI 1640 培养基(R10)在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下常规培养。经过对自发突变细胞的清除,自发突变频率为 5 × 10<sup>-5</sup> ~ 20 × 10<sup>-5</sup> 符合实验要求。

**1.1.3 主要试剂** 琼脂粉,日本进口分装;L-组氨酸,新兴医药保健品科技开发中心;D-生物素,TANABE SEIYAKU Co. Ltd 日本;S<sub>9</sub>,复旦大学公共卫生学院;RPMI 1640 培养基:Gibco 31800-022;马血清:Hyclone SH30074.03;三氟胸苷(trifluorothymidine, TFT) Sigma T2255;其余试剂均为国产或进口分析纯。

## 1.2 方法

**1.2.1 Ames 试验** 选用 TA<sub>97</sub>, TA<sub>98</sub>, TA<sub>100</sub> 和 TA<sub>102</sub> 菌株,采用标准平皿掺入法,试验在加与不加代谢活化系统下进行(-S<sub>9</sub>/+S<sub>9</sub>)。设计的马兜铃酸标准品、单味马兜铃和复方龙胆泻肝丸 3 种受试物,含马兜铃酸浓度均为 20 μg/ml。溶剂对照组(DMSO)每皿 100 μl,各剂量组均作 3 个皿,37℃ 培养 48 h 后记录回变菌落数。根据 OECD 有关规定判断标准定为:试验组回变菌落数超过阴性对照组 2 倍以上者为阳性反应,提示受试物具有致突变性。

**1.2.2 MLA 试验**<sup>[3]</sup> 细胞经受试物处理 3 h,继续培养 48 h(表达时间)以后,在含有 TFT 的 96 孔板中

接种一定数量的细胞。培养 10 d ~ 14 d 后,计数含有细胞集落的孔数。另外,在制作 TFT 平板同时制作测定平板效率(plating efficiency, PE)用的平板,计数含有细胞集落的孔数。按泊松分布计算基因突变率和平板效率。另外,测定处理后的细胞增殖率,作为细胞毒性的指标,将突变体集落按增殖性的不同,分大、小(large and small colony)2 种集落计数。平板效率(PE):PE<sub>0</sub> 和 PE<sub>2</sub> 按泊松分布进行计算

$$PE_n = -\ln(EW/TW)/N, n = 0, 2$$

式中 EW 为 96 孔板无集落孔数, TW 为 96 孔板总的孔数 N 为单孔细胞数,在此 N = 1.6。突变率(mutation frequency, MF)按泊松分布进行计算

$$MF = \frac{-\ln(EW/TW)/N}{PE_2}$$

式中 EW 为 TFT 其中 TFT 拮抗培养无集落孔数, TW 为总孔数 N 为孔的平均细胞数,此时为 2000。

数据评估采用国际遗传毒性测试工作组(international workgroup for genotoxicity tests, IWGT)制定的标准<sup>[4]</sup> MF 超过阴性的 126 即为阳性结果。

## 2 结果

### 2.1 Ames 试验结果

结果见表 1。经检验所有参数均服从泊松分布,试验组回变菌落数均未超过阴性对照组 2 倍,显示为阴性结果。

### 2.2 MLA 试验结果

由表 2 可见细胞培养体系中加入各受试物后, L5178Y/tk<sup>(+/-)</sup>-3.7.2 c<sup>-</sup> 细胞的接种效率(PE<sub>0</sub>)、相对存活率(RS)、相对悬浮增长率(RSG)均较阴性对照 DMSO 下降。马兜铃酸标准品和单味马兜铃 RTG 值均低于阴性对照组,尤其是单味组甚至低于马兜铃酸标准品,显示具有细胞毒性。在含有相同浓度马兜铃酸(5 μg/ml)剂量下,相对总增长率(RTG)由高到低排序为复方龙胆泻肝丸 > 阴性对照 DMSO > 马兜铃酸标准品 > 单方马兜铃 > MMS,显示复方龙胆泻肝丸对马兜铃

表 1 受试物(含马兜铃酸浓度 20 μg/mL)Ames 试验结果(̄x ± s)

Table 1 Mutagenicity of testers (with the concentration of AA as 20 μg/mL) in Ames test (̄x ± s)

Groups	TA <sub>97</sub>		TA <sub>98</sub>		TA <sub>100</sub>		TA <sub>102</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>	+S <sub>9</sub>
Negative Standard	131 ± 5	129 ± 11	27 ± 2	34 ± 4	136 ± 13	137 ± 11	337 ± 21	352 ± 11
Unilateralism								
aristolochiae	140 ± 14	110 ± 22	30 ± 4	26 ± 1*	124 ± 12	140 ± 17	363 ± 15	383 ± 15*
aristolochiae	143 ± 16	140 ± 2	26 ± 3	32 ± 5	105 ± 8*	150 ± 8	343 ± 21	345 ± 16
LDXGE	107 ± 22	129 ± 14	27 ± 3	29 ± 1	147 ± 2	134 ± 18	347 ± 15	357 ± 15
MMS	1 780 ± 28**	1 580 ± 28**	860 ± 57**	3 050 ± 71**	3 100 ± 141**	2 060 ± 57**	2 450 ± 71**	1 270 ± 42**

Compared with negative, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.



细胞毒性具有一定的减毒功效。经统计学分析,受试物组与阴性对照相比,RTG间的差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 2 试验受试物与L5178Y细胞毒性指标之间的关系

Table 2 The relation between testers and factors of cytotoxicity in L5178Y cells

Groups	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	PE <sub>0</sub> (%)	RS <sub>0</sub> (%)	RSG (%)	RTG (%)
Negative	-	75.9	100	100	100
Standard aristolochiae	5	53.5	70.49	64.56	61.81*
Unilateralism aristolochiae	5	0	0	39.51	21.48*
LDXGE	5	0	0	84.84	143.77*
MMS	10	26.4	38.9	23.4	6.0*

PE<sub>0</sub>:plating efficiency; RS<sub>0</sub>:relative survival; RSG:(relative suspension growth, RSG); RTG:(relative total growth,RTG);Compared with negative,\* $P < 0.05$ .

### 2.3 受试物对L5178Y细胞 tk 基因的致突变性

由表 3 可以看出,马兜铃酸标准品诱发的突变频率超过阴性对照 1 倍以上但不到 2 倍,具有致突变性但不强烈。单味马兜铃 MF 值甚至高于马兜铃酸标准品。在含有相同浓度马兜铃酸(5  $\mu\text{g/ml}$ )剂量下,MF 由高到低排列为:MMS > 单方马兜铃 > 马兜铃酸标准品 > 阴性对照 DMSO > 复方龙胆泻肝丸,MF 超过阴性的 126 即为阳性结果,试验结果显示单方马兜铃为阳性结果,而复方龙胆泻肝丸为阴性结果。提示复方龙胆泻肝丸较之单味具有一定的遗传毒性减毒功效。

表 3 受试物对L5178Y细胞 tk 基因的致突变性

Table 3 Mutagenicity at the tk locus in L5178Y cells after treatment with testers for 3 h

Groups	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	PE <sub>2</sub> (%)	RS <sub>2</sub> (%)	MF ( $\times 10^{-6}$ )	SC (%)
Negative	-	87.3	100	147.1	53.2
Standard aristolochiae	5	83.58	95.74	201.66*	57.22
Unilateralism aristolochiae	5	47.46	54.36	292*	88.33
LDXGE	5	147.95	169.47	11.4	60
MMS	10	22.6	25.8	1 649.3**	63.7

PE<sub>2</sub>:plating efficiency after treatment for two days; RS<sub>2</sub>:relative survival after treatment for two days; MF:mutation frequency;SC:small colony;Compared with negative,\* $P < 0.05$

## 3 讨论

Ames 试验是从原核水平检测基因突变最常用的方法,它是一种快速获得化学物质致突变性以及潜在致癌性资料的有效手段,主要检测的遗传学终点为基因内的点突变和移码突变,因此本试验中 Ames 试验的阴性结果并不代表受试物无遗传毒性,本试验又从细胞水平探讨马兜铃酸复方中药不同于单味中药的细胞毒性及其遗传毒性特点。大量的临床和体外实验表明马兜铃酸复方中药不同于马兜铃酸和单味中药,马兜铃酸复方中药体内减毒的作用已经被广泛证实<sup>[2,5]</sup>。本试验表明,在

相同的马兜铃酸浓度下,复方中药对 L5178Y/ tk<sup>(+/-)</sup>-3.7.2c-小鼠淋巴瘤细胞造成的细胞毒性和遗传毒性均显著低于单味中药,有明显的减毒作用,其具体的减毒机制尚待进一步的研究。

近十几年来随着相关领域特别是分子生物学的发展和人们对遗传毒性认识的深入,遗传毒性测试评价方法也正在经历巨大的变化<sup>[6]</sup>。然而由于目前没有单独一个遗传毒性试验方法可检测所有的遗传毒性终点,因此,食品药品以及生物材料的遗传毒性的评价大多采用组合试验的方法,现在 Ames 试验以及 MLA 试验被 OECD 和 ICH 指导原则认定为遗传毒性的基本组合试验<sup>[7]</sup>,ISO- 国际标准化组织 (ISO10993-3:2003) 也推荐使用这两个试验进行综合评价。

小鼠淋巴瘤细胞检验 (MLA) 的突出优点在于它能检测多个遗传学终点,与传统的 HPRT 的基因突变试验相比,MLA 不仅能检测出点突变等小的基因突变,也能检测大范围的缺失等大的基因变化以及染色体畸变<sup>[8]</sup>,甚至对突变谱也能做出分析。点突变以大集落的形式被检出,染色体畸变则通过小集落的形式被检出。本试验中通过小鼠淋巴瘤细胞实验 (MLA) 对含马兜铃酸中药的单味和复方制剂进行致突变性研究,结果显示单方马兜铃多为小集落形式的突变,提示单味中药以引发染色体水平上的大范围畸变和损伤为主。

## 参考文献:

- [1] 胡世林,胡咏川,张宏启. 论马兜铃酸与含马兜铃酸的中药[J]. 中医药现代化,2003,5(6):68-71.
- [2] 左建平. 马兜铃属植物肾毒性研究进展[J]. 中国药业,2003,12(4):74.
- [3] 谢明. 小鼠淋巴瘤细胞突变试验方法[J]. 癌变·畸变·突变,2003,15(3):185-186.
- [4] Moore MM, Honma M, Clements J, et al. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: International workshop on genotoxicity tests workgroup report-Plymouth, UK 2002[J]. Mutat Res,2003,540(2):127-140.
- [5] 李春香,朱晓卉,丁芳. 配伍降低关木通肾毒性的研究现状[J]. 河北中药医学报,2005,20(2):35-37.
- [6] 张天宝. 新药遗传毒性评价方法的研究现状和发展趋势[J]. 癌变·畸变·突变,2002,14(4):243-246.
- [7] Hozier J, Scalzi J, Sawyer J, et al. Localization of the mouse thymidine kinase gene to the distal portion of chromosome 11 [L]. Genomics,1999,10(7):827-830.
- [8] Chen T, Harrington-Brock K, Moore MM. Mutaant frequencies and loss of heterozygosity induced by N-ethyl-N-nitrosourea in the thymidine kinase gene of L5178Y/TK<sup>(+/-)</sup>-3.7.2c mouse lymphoma cells [J]. Mutagenesis,2002,17(2):105-109.