

用 Ames 法和致畸试验研究醋氨己酸锌的遗传毒性

马明福¹ 李练兵¹ 曾维三¹ 徐小丽¹ 王治乔²

¹重庆市计划生育科学研究所 重庆 400020 ²军事医学科学院毒物药物研究所 北京 100850

摘要 用 Ames 试验和致畸试验对醋氨己酸锌进行了致突变和致畸作用研究。结果表明醋氨己酸锌在 Ames 试验的 TA97、TA98、TA100 和 TA102 4 个标准菌株 $\pm S_{9mix}$ 条件下, 1 - 5000 μ g/皿 6 个剂量的标准平皿掺入试验中, 未诱发各菌株阳性突变反应。小鼠致畸试验 32.79mg/kg·bw、262.34mg/kg·bw 和 524.67mg/kg·bw 剂量组, 在母鼠妊娠期 6 - 15d p.o 给药, 各剂量组活胎率与溶剂对照组比较, 无显著差异 ($P > 0.05$)。对胎鼠外观、骨骼和内脏无致畸作用。但 524.67mg/kg·bw 组对妊娠母鼠体重、胎鼠体重和尾长有影响, 显示一定的母体和胚胎毒性。

关键词 醋氨己酸锌; 突变; 致畸作用

STUDY ON THE GENOTOXICITY OF ZINC ACEXAMATIE BY THE AMES TEST AND TERATOGENIC TEST

Ma Mingfu¹, Li Lianbing¹, Zeng Weishan¹, Xu xiaoli¹, Wang Zhiqiao²

¹Chongqing Family Planning Scientific Research, Chongqing 400020, ²Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850

Abstract This paper reported the research results of mutagenicity and teratogenicity effect of zinc acexamatie. The result showed that zinc acexamatie with doses level (1 - 5000 μ g/plate) did not induce positive mutations of strains TA₉₇、TA₉₈、TA₁₀₀ and TA₁₀₂ with or without S_{9mix} in Ames test. It was divided into three groups of Zinc acexamatic received (po) dosages of 32.97mg/kg. body weight, 262.34mg/kg. body weight, 524.67mg/kg. body weight on the 6th to 15th day of gestation mouse respectively in the teratogenic test. The frequency of live fetuses of each dose group were no significant difference as compared with solvent control group. It did not cause deformity of the fetus appearances, bone and internal organs. But there were significant differences between solvent control group and 524.67mg/kg group in the growth of body weight in gestation of mouse, body weight and tail length in fetus. The result showed that zinc acexamatie possess maternal toxicity and embryotoxicity.

Key words zinc acexamatie; mutation; teratogenic effects

醋氨己酸锌 (Zinc acexamatie) 临床主要用于治疗急性消化性溃疡和十二指肠溃疡, 其疗效与雷尼替丁和法莫替丁比较无显著差异, 可减轻消化性溃疡的炎症。为了解该药有无潜在致突变和致畸作用, 用 Ames 法和小鼠致畸试验对醋氨己酸锌进行了致突变与致畸胎性研究, 结果报告如下。

材料与方法

1 实验材料

1.1 药物 醋氨己酸锌为白色粉末, 批号 921031, 纯度 99.4%, 由辽宁省药物所提供。试验前用蒸馏水配制并稀释至所需浓度。

1.2 阳性诱变剂 正定霉素 (Dau, Sigma), 甲基甲烷磺酸酯 (MMS, Schuchard), 2 - 氨基苄 (2 - AF, Fluka), 1.8 - 二羟蒽醌 (Dan, Sigma), 环磷酰胺 (CP, 上海第十二制药厂)。

1.3 试验菌株、培养基和 S_{9mix} TA₉₇、TA₉₈、TA₁₀₀ 和 TA₁₀₂ 菌株由 Ames 教授提供, 液氮贮存。试验菌

株用氨苄青霉素和氨苄青/四环素主平皿 4 保存。菌株增菌,基因型鉴定, S_{9mix}及各种试验用培养基均按标准⁽¹⁾执行。

1.4 动物 昆明种健康小鼠,鼠龄 2.5 个月,体重雄性 42.6 ±4.0g,雌性 35.9 ±4.2g,由第三军医大学实验动物中心提供。

2 实验方法

2.1 Ames 试验 采用标准平皿掺入法。将醋氨己酸锌分成 1 - 500μg/皿 6 个剂量,在 S_{9mix}条件下每一剂量做 3 皿。试验设自发回变、溶剂、S_{9mix}和阳性对照,结果判断按标准⁽¹⁾。

2.2 致畸试验 根据文献^(2,3,4),将小鼠按雌:雄(2:1)同笼,以阴栓查到之日为妊娠 0 天。将受精鼠随机分组,每组 > 25 只。醋氨己酸锌分为 32.79mg/kg/d、262.34mg/kg/d 和 524.67mg/kg/d (相当于 1/

48LD₅₀、1/6LD₅₀和 1/3 LD₅₀) 3 组。另设溶剂和 CP 阳性对照组。于孕鼠 6 - 15d,每天 P0 一次,连续 10d。给药体积为 0.2ml/10g bw。溶剂组用等体积蒸馏水 P0 给药。阳性剂 CP 10mg/KG,于孕鼠 9 - 11d 给药,体积为 0.1ml/10g bw。数据的统计方法为平均体重、平均着床数、平均活床数、平均活胎体重用 *t* 检验,妊娠率、活胎率用 χ^2 检验,窝吸收率、死胎率、畸胎率用非参数统计。

结 果

1 Ames 试验

菌株的基因型鉴定符合试验要求,受试物在 ± S_{9mix} 条件,1 - 5000μg/皿 6 个剂量浓度所对应的回变菌落数均未超过自发回变 2 倍,并得到三次重复试验证明,结果阴性。而阳性诱变剂所对应的菌株均诱发了较高的回复突变菌落数,呈明显阳性,见表 1。

表 1 醋氨己酸锌的 Ames 试验结果 ($\bar{x} \pm s$)

剂量 μg/皿	TA ₉₇		TA ₉₄		TA ₁₀₀		TA ₁₀₂	
	- S ₉	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉
1	165.71 ±17.75	146.11 ±25.99	52.44 ±14.86	36.33 ±5.52	187.77 ±15.20	185.33 ±21.04	236.55 ±10.40	243.11 ±23.47
10	176.11 ±20.17	150.44 ±28.83	51.55 ±12.73	34.00 ±3.70	202.66 ±26.38	202.44 ±18.80	245.55 ±13.92	242.00 ±20.40
100	165.22 ±17.83	159.77 ±23.80	55.77 ±12.96	34.11 ±3.39	193.33 ±30.21	207.33 ±43.30	249.88 ±15.84	250.11 ±21.95
1 000	163.77 ±10.63	157.00 ±18.53	55.67 ±12.00	40.33 ±11.94	203.11 ±20.45	200.44 ±39.36	251.22 ±8.62	266.00 ±28.01
2 000	158.77 ±21.60	173.77 ±22.80	34.33 ±2.82	48.22 ±12.14	210.40 ±19.95	188.44 ±42.44	256.44 ±23.49	261.55 ±20.35
5 000	161.44 ±12.76	160.00 ±20.51	49.66 ±12.81	43.00 ±7.64	194.88 ±34.45	167.77 ±29.24	260.33 ±13.98	232.88 ±80.13
自发回变对照	154.62 ±11.84	123.88 ±18.38	49.50 ±6.00	41.55 ±7.92	194.31 ±12.74	171.44 ±37.15	227.00 ±14.79	251.88 ±13.53
溶剂对照	125.10 ±36.95	148.88 ±16.63	53.92 ±7.62	37.78 ±6.37	202.00 ±36.65	178.44 ±32.80	233.40 ±23.33	242.55 ±22.17
S _{9mix} 对照		140.00 ±16.94		39.00 ±9.02		193.11 ±19.77		254.00 ±19.17
阳性对照	MMS 1μl/皿	2 - AF 10μg/皿	Dau 10μg/皿	2 - AF 10μg/皿	MMS 1μl/皿	2 - AF 10μg/皿	MMS 1μl/皿	1.8 - Dau 60μg/皿
	1055.62 ±476.87	1113.33 ±241.50	1098.25 ±262.75	1138.66 ±113.32	1471.87 ±246.67	1084.77 ±443.74	1518.00 ±324.78	720.33 ±62.81

2 致畸试验

2.1 醋氨己酸锌对孕鼠体重的影响 各给药组妊娠期母鼠体重与溶剂组比较,无显著性差异 ($P < 0.05$)。

高剂量组妊娠期母鼠净增重与溶剂组比较,有显著性差异 ($P < 0.01$),见表 2。

表 2 醋氨己酸锌对母鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量 (mg/kg)	具活胎孕鼠数 (只)	妊娠期体重(g)				增重 ^a (g)
			d0	d6	d12	d18	
溶剂对照	20.00 ^b	20	38.7 ±4.3	41.7 ±4.7	48.4 ±5.6	63.8 ±7.1	3.3 ±2.5
醋氨己酸锌	37.76	22	38.9 ±3.5	41.6 ±3.6	48.8 ±4.7	63.6 ±5.0	2.3 ±4.1
醋氨己酸锌	262.34	21	38.5 ±3.2	40.9 ±3.7	46.1 ±4.1	59.7 ±6.9	2.6 ±4.0
醋氨己酸锌	524.67	23	39.8 ±2.8	42.8 ±3.0	47.2 ±3.6	60.0 ±5.7	- 1.3 ±4.6 ^d
环磷酰胺	10.00	16	37.5 ±3.2	40.4 ±3.2	46.9 ±3.9	56.9 ±5.6 ^c	7.4 ±4.2 ^d

a. 母鼠增重 = 处死时母鼠体重 - 妊娠第 6 天体重 - 处死时子宫重(包括胎鼠重); b. ml/KG; c. 与溶剂对照组比较 $P < 0.05$; d. 与溶剂对照组比较 $P < 0.01$

2.2 醋氨己酸锌对小鼠胚胎发育的影响 各剂量组 对小鼠的受孕率、平均着床数及窝平均活胎数、活胎

率无影响。吸收率和死胎率与溶剂组比较,无显著性差异 ($P > 0.05$),各剂量组未见外观畸形。而 CP 外观畸形率为 95.7%,主要畸形表现为开眼,足外翻,卷尾和短尾等,见表 3。

表 3 醋氨己酸锌对小鼠生殖的影响

组别	剂量 (mg/ KG)	受精鼠 (只)	孕鼠 (只)	受孕率 (%)	检测窝数	总着床数 (个)	平均着床数 ($\bar{x} \pm s$)	活胎				吸收胎		死胎		外观畸形	
								窝数	胎鼠(只)	窝均数 ($\bar{x} \pm s$)	活胎率 (%)	窝数	吸收率 ^a (%)	窝数	死胎率 ^a (%)	窝数	畸形率 (%)
溶剂对照	20.00 ^b	25	20	80.0	20	220	11.0 ±2.9	20	202	10.1 ±3.1	91.8	9	7.3	2	0.9	0	0.0
醋氨己酸锌	32.79	30	22	73.3	22	252	11.5 ±3.2	22	235	10.7 ±3.3	93.3	8	5.4	2	1.2	0	0.0
醋氨己酸锌	262.34	30	21	70.0	21	209	10.0 ±3.6	21	185	8.8 ±3.7	88.5	13	8.6	4	2.9	0	0.0
醋氨己酸锌	524.67	30	23	76.7	23	284	12.4 ±2.0	23	257	11.2 ±2.4	90.5	13	7.4	4	2.1	0	0.0
环磷酰胺	10.00	25	21	84.0	21	204	9.7 ±2.3	16	116	7.3 ±4.0	56.9 ^c	7	4.9	18	38.2 ^c	15	95.7 ^c

a. 检出胎鼠数占总着床数的百分比; b. ml/ KG; c. 与溶剂对照组比较 $P < 0.01$

2.3 醋氨己酸锌对胎鼠生长发育的影响 32.79mg/ KG. bw 和 262. mg/ KG. bw 组对胎鼠的体重、身长和尾长无影响。CP 组胎鼠的体重、身长和尾长与溶剂组比较,有非常显著性差异 ($P < 0.01$),见显著性差异,前者 $P > 0.01$,后者 $P > 0.05$ 。表 4。

表 4 醋氨己酸锌对胎鼠生长发育的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/ KG)	测量 窝数	体重(g)	身长(cm)	尾长(cm)
溶剂对照	20.00 ^a	20	1.42 ±0.14	2.72 ±0.09	1.17 ±0.06
醋氨己酸锌	32.79	22	1.46 ±0.19	2.73 ±0.12	1.19 ±0.06
醋氨己酸锌	262.34	21	1.40 ±0.13	2.69 ±0.09	1.16 ±0.07
醋氨己酸锌	524.67	23	1.30 ±0.13 ^b	2.66 ±0.08	1.14 ±0.04 ^c
环磷酰胺	10.00	16	0.99 ±0.11 ^b	2.01 ±0.18 ^b	0.41 ±0.22 ^b

a. ml/ KG; b. 与溶剂对照比较 $P < 0.01$; c. 与溶剂对照比较 $P < 0.05$

2.4 醋氨己酸锌各剂量组有胸骨发育不全,缺肋或多肋等异常,与溶剂组比较,无显著性差异 ($P < 0.05$)。CP 组骨骼畸形率为 60.9%。各剂量组上枕骨骨化程度⁽³⁾与溶剂组比较,无显著性差异 ($P > 0.05$),见表 5。

表 5 醋氨己酸锌对胎鼠骨骼系统的影响^a

组别	剂量 (mg/ KG)	胎鼠 (只)	上枕骨骨化程度				胸骨发育不全	缺肋或多肋	畸形率 (%)	
			0级	1级	2级	3级				
溶剂对组	20.00 ^b	148	142 (95.9)	5 (3.4)	1 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	11 (7.4)	5 (3.4)	13 (8.8)
醋氨己酸锌	32.79	171	166 (97.1)	5 (2.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	11 (6.4)	1 (0.6)	12 (7.0)
醋氨己酸锌	262.34	138	133 (96.4)	5 (3.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (3.6)	1 (0.7)	6 (4.3)
醋氨己酸锌	524.67	183	177 (96.7)	5 (2.7)	1 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	15 (8.2)	3 (1.6)	18 (9.8)
环磷酰胺	10.00	82	29 ^c (35.4)	13 ^c (15.9)	9 ^c (11.0)	27 ^c (32.9)	4 ^c (4.9)	47 ^c (57.3)	18 ^c (22.0)	50 ^c (60.9)

a. 表中数据为检出胎鼠数及所占胎鼠总数的百分比 (%) ; b. ml/ kg; c. 与溶剂对照比较 $P < 0.01$

天宝肿宁散对五种肿瘤细胞抑制作用的实验研究

周 俊¹ 张月明² 殷学军¹ 闫 浩² 孙健玲²

¹兰州军区乌鲁木齐总医院临床医学研究所 乌鲁木齐 830000 ²新疆医学院预防医学系 乌鲁木齐 830054

摘要 采用体外细胞培养法观察“天宝肿宁散”方剂对小鼠成纤维细胞(3T3)和人膀胱癌细胞(EJ)、人喉癌细胞(Hep-2)、人低分化粘液腺胃癌细胞(MGC-803)、人肝癌细胞(Q3)以及人肺癌细胞(Spc-A-1)等肿瘤细胞的细胞存活量的影响,并以此评价该方剂对各株细胞生长的抑制作用,结果显示该方剂在体外能显著抑制肿瘤细胞生长,并呈一定剂量效应关系,而对3T3细胞未呈现出抑制作用。说明该方剂具有作为抗癌药开发利用的价值。

关键词 中药方剂;肿瘤细胞;抑制作用

THE EXPERIMENTAL STUDY ON THE INHIBITION EFFECTS AT FIVE CANCER CELLS OF “TIAO BAO ZHONG NING SAN”

Zhou Jun¹, Zhang Yueming², Yin Xuejun¹, et al

¹Institute of Clinical Medicine, Urumqi General Hospital of Lanzhou Command, PLA, Urumqi 830000 ²XinJiang Medical College, Urumqi 830054

2.5 醋氨己酸锌对胎鼠内脏系统影响 徒手切片检查各剂量组胎鼠内脏系统未见畸形,CP组畸形率为62.5%,主要表现为腭裂、脑积水等畸形。

讨 论

在 Ames 试验和小鼠致畸试验中,为使受试剂量准确和溶液在药物中不产生变化,均在试验前现配现用,未经过高压灭菌处理直接用于试验。用 Ames 纸片点试法对该药在 0.1 - 5000 μ g/片的 8 个不同剂量进行了粗筛,了解药物在不加 S_{9mix} 时有无致突变作用和为平皿掺入试验选择受试剂量提供实验依据。经重复试验证明,醋氨己酸锌各剂量组回变菌落数均在正常范围,对 Ames 试验的 4 个标准菌株无诱发突变作用。

致畸试验中,阳性诱变剂诱发了受试小鼠明显的外观、骨骼、内脏畸形,表明所选小鼠对致畸剂反应敏感。而受试药物各个剂量在给药时间上覆盖了动物对致畸原的整个致畸敏感期、溶剂对照组的母鼠体

重、生殖能力、胎鼠生长发育、畸形率均在正常范围。而醋氨己酸锌在 524.67mg/KG 组对胎鼠体重和尾长有一定影响,可能是由于剂量高所致。各剂量组的胎鼠骨骼系统畸形与溶剂对照比较无显著差异,内脏系统亦未见畸形,说明该药各剂量组对小鼠均不诱发外观、骨骼和内脏畸形。

上述结果表明,醋氨己酸锌在本实验条件下无诱发 Ames 试验菌株突变和小鼠致畸作用,为该药的遗传毒性评价提供了依据。

参考文献

- 1 Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res*, 1983;113(4):173
- 2 Wilson J.G. Handbook of teratology. New York: plenum press, 1978:191
- 3 吴德生,董奇男,衡正昌,等. 在致畸试验研究中小鼠胚胎发育迟缓的评价指标. 四川医学院学报,1984;15(1):59
- 4 印木泉. 内脏检查法在致畸实验中的应用. 第二军医大学学报, 1985;6(4):23 (1998-09-29 收稿;1999-03-01 修回)