

羧乙基锗倍半氧化物(Ge-132)的抗诱变作用研究

金淑琴 李袁丽

天津医科大学卫生毒理教研室 300070

摘要 本研究用果蝇伴性隐性致死(SLRL)实验,鼠伤寒沙门氏菌回复突变实验(Ames)实验,小鼠骨髓细胞微核(MN)实验分别检测了 Ge-132 的抗诱变作用,结果表明:Ge-132 在低浓度一定范围内(0.1%,0.01%)对甲基磺酸乙酯诱发果蝇 S1RL 突变具有较弱的抗诱变作用 Ge-132 对 2-氨基芴诱发的 TA98、TA100 回变无抗诱变作用,对环磷酰胺诱发小鼠骨髓细胞微核效应呈现剂量反应关系的抗诱变作用,但由于 Ge-132 处理组微核率仍远远高于阴性对照组,故认为抗诱变作用有限,并认为除在特殊适应症人群中可适量应用 Ge-132 外,健康人群中不提倡使用。

关键词 Ge-132;抗诱变;SLRL 实验;Ames 实验;微核实验

STUDY ON THE ANTIMUTAGENIC EFFECT OF CARBOXYETHYL GERMANIUM SESQUIOXIDE(GE-132)

Jin Shuqin li Xili

Division of Toxicology, Department of Public health, Tianjin Medical University 300070

Abstract Antimutagenic effect of Ge-132 was investigated with sex-linked recessive lethal (SLRL) test, Ames test and mouse bone-marrow micronucleus test. According to the result, in certain low dose range (0.1% - 0.01%) Ge-132, possesses weak antimutagenic effect on ethyl methylsulphonate induced SLRL in *Drosophila melanogaster*; Ge-132 is not antimutagenic on 2-aminofluoren-induced TA98, TA100 reverse mutation; Ge-132 possesses certain antimutagenic effect on cyclophamide-induced mouse bonemarrow micronucleus, since the rate of micronucleus of Ge-132 treated group was still remarkably higher than that of the negative control, it is suggested that the antimutagenic effect of Ge-132 is limited. According to results of our study and references, we consider that Ge-132 might be used in specific human group at certain low dose range, but can't be used in healthy populations in general.

Key words Ge-132; Antimutagenic; SLRL test; Ames test; Micronucleus test

当前,由于 Ge-132 生物活性广泛,人们将其普遍用于医疗保健,但并不是所有的

应用开发 Ge-132 的人对其都有正确认识,而是将其作用过于夸张,从而造成某些不合理应用 Ge-132 的事件发生。虽然 Ge-132 毒性极低,但我们仍见到了少数动物和人因服用它而出现肾功能障碍的报道^(1,2)。因此,提醒人们注意安全使用 Ge-132 是非常重要的。为进一步开发 Ge-132 的生物功能并为人们安全合理使用提供理论根据,本研究在多种测度系统中进行了其抗诱变性检测,取得了较为有价值的结果。并根据本研究结果及有关文献提出对 Ge-132 应用的一点看法,希望能对客观认识 Ge-132 有所帮助。

材料和方法

1. 试剂

Ge-132 由天津市轻工学院提供,纯度 99.9%,实验前分别用 5%蔗糖水、1/15M 磷酸盐缓冲液(PH7.4)、蒸馏水配成 1%溶液备用,稀释得 0.1%、0.01%应用液;甲基磺酸乙酯(EMS),实验前用 5%蔗糖水配成 0.015M 应用液;二-氨基芴(2-AF),用二甲基亚砷配制成 0.01%应用液;环磷酰胺(CP)用蒸馏水配成 0.2%应用液。

2. 实验动物及菌株

黑腹果蝇 Oregon K 品系(圆红眼)和 Basc 品系(杏棒眼),由上海第二军医大学提供;昆明种小鼠体重 20-25g 随机分 5 组,每组 8 只,雌雄各半,鼠伤寒沙门氏菌标准菌株 TA97、TA98、TA100、TA102,均为本室保存的菌株。

3. 实验方法

3.1 果蝇测试系统抗 SLRL 实验^(3,4)测定

预实验,包括表型鉴定,自发突变率,适口性及毒性,生育力及 Ge-132 对果蝇的

SLRL 诱变性等试验。在毒性试验中,由于实验条件下 Ge-132 最大溶解度 1%不引起果蝇死亡,未能计算 LC50,因此,以 1%浓度进行诱变性检测。

根据预试验结果,抗诱变实验共设 4 组,阳性对照组为 5%蔗糖水对 0.015M EMS, Ge-132 处理组为 1%、0.1%、0.01%Ge-132 分别抗 0.015M EMS,各组均处理 50 只雄蝇,雄蝇饥饿 4 小时后,先喂饲 5%蔗糖水或不同浓度 Ge-132 溶液 48 小时,再喂饲 0.015M EMS 24 小时,按 2-3-3 分窝程序与 Basc 处女蝇 1:3 交配,F1 代肾形红眼雌蝇与杏棒眼雄蝇按 1:3 交配,最后用 χ^2 检验对各组致死率进行统计学分析并计算下降系数 reduction factor⁽⁴⁾,下降系数越小,抗诱变作用越显著。

$$\text{下降系数}(\%) = \frac{\text{抗诱变组致死率}}{\text{阳性对照组致死率}} \times 100$$

3.2 Ames 测试系统中抗诱变实验方法

预试验包括菌株鉴定和 Ge-132 对 TA97、TA98、TA100、TA102 的诱变性检测,采用平板掺入法,±S9 两个系列,每剂量均作 3 个平行样本并进行重复试验。确证 Ge-132 在该系统无诱变性后再进行抗诱变试验。

抗诱变实验用 TA98、TA100 进行,平板掺入法+S9。实验共设 4 组:阳性对照组为磷酸盐缓冲液加 2-AF(10 μ g/皿),实验组分别为 1000、100、10 μ g/皿 Ge-132 加 2-AF(10 μ g/皿)。按常规法进行实验,计数回变菌落,经方差分析及 Dunnett's t 检验进行统计学处理并计算抑制率⁽⁶⁾

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{抗诱变组回变菌落数} - \text{自发回变菌落}}{\text{阳性对照回变菌落数} - \text{自发回变菌落}} \times 100$$

3.3 对微核效应的抗诱变实验方法

采用间隔 24 小时 2 次经腹腔注射给小鼠阳性对照物 CP. 第 2 次给药后 6 小时杀鼠取材,按杨小奇⁽⁷⁾经灌胃给予小鼠 Ge-132, 设 5 个实验组,阴性对照为蒸馏水,阳性对照用 20mg/kg CP,抗诱变组分别用 50、100、

300mg/kg Ge-132 和 20mg/kg CP 染毒。常规制片后每只动物计数 1000 嗜多染红细胞 (PCE) 计算微核率和微核抑制率。各组微核数按泊松分布经平方根变换后进行方差分析及 Dunnett's t 检验。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{加药组微核 PCE 数} - \text{自发微核 PCE 数}}{\text{阳性对照组微核 PCE 数} - \text{自发微核 PCE 数}} \times 100$$

结 果

1. 果蝇测试系统抗 SLRL 突变实验结果

1.1 预试验结果

表型鉴定、自发突变率、适口性及毒性和生育力等试验结果均符合要求。Ge-132 对

果蝇 SLRL 诱变性检测结果见表 1。经 Abbott's 公式校正前后致死率均在自发突变率范围内,提示 Ge-132 在实验剂量下对果蝇无 SLRL 诱变作用。

表 1. Ge-132 在果蝇测试系统 SLRL 诱变性检测结果

分组	窝别	天	受试染色体数				具有 n 个致死的雄蝇数				
			总数	阴性数	致死数	SLRL(%)	n=1	2	3	4	5
阴性对照组 (5%蔗糖水)	I	0-2	957	956	1	0.104	1				
	II	2-5	963	962	1	0.104	1				
	III	5-8	954	953	1	0.105	1				
	I-III	0-8	2874	2871	3	0.104	3				
阳性对照组 (0.0015M EMS)	I	0-2	108	84	24	22.222	3	8			1
	II	2-5	112	89	23	20.536	9	2	2	1	
	III	5-8	109	89	20	18.349	6	5		1	
	I-III	0-8	329	262	67	20.365	18	15	2	2	1
1%Ge-132	I	0-2	946	944	2	0.211	2				
	II	2-5	955	953	2	0.209	2				
	III	5-8	960	958	2	0.208	2				
	I-III	0-8	2861	2855	6	0.209	6				

1.2 抗 SLRL 诱变实验结果

1%Ge-132 组各窝及总致死率与阳性对照组比较均无统计学差异,未发现抗诱变效应,0.1%Ge-132 组各窝致死率与阳性对照性比亦无统计学差别,但总致死率与阳性对照组有显著性差异,下降系数为 83.094%,0.01%Ge-132 组各窝及总致死率与

阳性对照组比较有显著性差别,下降系数分别为 72.165%、72.079%、69.915%、71.035%,显示了一定的抗诱变作用。见表 2。

2. Ames 测试系统诱变试验结果

2.1 预试验结果

各菌株鉴定合格,Ge-132 对 TA97、TA98、TA100、TA102 在实验条件下无诱变

性。

表 2 Ge-132 对 EMS 诱发果蝇 SLRL 突变率的影响

分 组	窝 别	天	受试染色体数				具有 n 个致死的雄蝇数					下降因子 (%)	χ^2	P	
			总数	阴性数	致死数	SLRL (%)	n=1	2	3	4	5				
阳性对照组	I	0-2	457	360	97	21.225	11	34	2	3					
5%蔗糖水+ 0.015M EMS	I	2-5	436	355	81	18.578	15	27	3	2					
	II	5-8	411	338	73	17.761	20	22	2	2					
	I-II	0-8	1304	1053	251	19.248	46	83	7	7					
1% Ge-132 +0.015M EMS	I	0-2	453	361	92	20.309	16	21	10	1			0.07	>0.05	
	I	2-5	460	382	78	16.957	23	20	5				0.29	>0.05	
	II	5-8	427	358	69	16.159	15	23	3				0.27	>0.05	
	I-II	0-8	1340	1101	239	17.836	54	64	18	1			0.78	>0.05	
0.1% Ge-132 +0.015M EMS	I	0-2	476	395	81	17.017	26	11	8	1	1		2.41	>0.05	
	I	2-5	443	371	72	16.253	24	14	4	2			0.67	>0.05	
	II	5-8	419	358	61	14.558	21	7	6	2			1.34	>0.05	
	I-II	0-8	1338	1124	214	15.994	71	32	18	5	1	83.094	4.50	<0.05	
0.01% Ge-132 +0.015M EMS	I	0-2	457	387	70	15.317	37	8	3	2			72.165	4.95	<0.05
	I	2-5	463	401	62	13.391	17	16	3		1		72.079	4.14	<0.05
	II	5-8	433	380	53	12.240	33	8		1			69.915	4.63	<0.05
	I-II	0-8	1353	1168	185	13.673	87	32	6	3	1	71.035	17.68	<0.01	

2.2 抗诱变实验结果

方差分析表明,TA98 各剂量组回变菌落数与阳性对照组无统计学差异 ($F=0.364, P>0.05$),TA100 抗诱变组与阳性组差

别显著 ($F=8.106, P<0.01$), 进一步 Dunnett's t 检验表明,各剂量组与阳性对照组均有显著差异,但抑制率均小于 30%,见表 3。

表 3 Ge-132 对 2-AF 诱发 TA98 TA100 回复突变的影响

分 组	Ge-132 ($\mu\text{g}/\text{皿}$)	2-AF ($\mu\text{g}/\text{皿}$)	TA98		TA100		
			回变菌落数		回变菌落数	抑制率 (%)	q
			$(\bar{x} \pm s)$		$\bar{x} \pm s$		
阳性对照	0	10	1058.8 \pm 40.8		477.8 \pm 23.8		
抗诱变组	10	10	1083.7 \pm 68.5		393.8 \pm 63.8	24.3	3.54*
	100	10	1088.7 \pm 72.7		380.3 \pm 39.7	28.2	4.11*
	1000	10	1063.2 \pm 40.8		376.5 \pm 29.3	29.3	4.27*

TA100 自发回变数为 131.7 \pm 19.4, * $P<0.05$

3 微核效应抗诱变实验结果

方差分析结果表明,Ge-132 组与阳性组微核率之间有统计学差异 ($F=75.90, P<0.01$),进一步 Dunnett's t 检验结果表明,各

组均与阳性组有统计差异抑制率分别为 27.586%,45.690%,67.241%,显示了一定的抗诱变作用。见表 4。

表4 Ge-132对CP诱发小鼠骨髓细胞微核效应的影响

分 组	Ge-132		Ge-132		n	PCE 数	微核数	微核率 (%)	q [*]	抑制率 (%)
	mg/kg	天	mg/kg	天						
阴性对照	0	3	0	2	8	8000	20	2.500±0.913		
阳性对照	0	3	20	2	8	8000	136(32.937)	17.000±1.603		
抗诱变组	50	3	20	2	8	8000	104(28.812)	13.000±1.690	5.265 *	27.586
	100	3	20	2	8	8000	83(25.738)	10.375±1.506	9.184 *	45.690
	300	3	20	2	8	8000	58(21.493)	7.625±1.598	14.592 *	67.241

n:实验动物数,括号为平方根变换值,* $P<0.01$,自发突变数为20

讨 论

由表2可见,Ge-132仅在低浓度下(0.1%,0.01%)对EMS诱发的SLRL突变有较弱的抗诱变作用,1%组未见抗诱变效应。曾有报道,赖氨酸锆在低浓度下可使果蝇延寿而高浓度使寿命缩短。尽管0.1% 0.01% Ge-132显示了一定抗诱变作用,但下降系数仍高达69.915%,未低于50%,表明抗诱变效应有限。文献记载,Ames系统以回变菌落数少于阳性对照组一半判为抗诱变有效⁽⁸⁾,由表3可见Ge-132对2-AF诱发的TA100回变仅为29.3%,据上述原则,不能认为Ge-132对2-AF诱发的TA100回变有抗诱变作用,即本实验条件下未见Ge-132对2-AF诱发TA98、TA100回变有抗诱变作用。另有文献报道,300mg/kg Ge-132对小鼠免疫功能有较大调节作用,本研究中同样见到这一剂量对微核的拮抗作用,抑制率达67.241%,虽然如此,该剂量组微核率7.25%仍远高于阴性对照组的2.5%,故认为抗诱变作用有限。结合本研究及有关文献,认为Ge-132虽然在某些测试系统存在一定的抗诱变作用,但并不显著。

锆在自然界并不缺乏,许多中药和茶叶中均含有较多的锆化合物。日本幡山等分析了当地36种食品,其中31种含锆,谷类0.33、种籽类0.36、有色蔬菜0.064,平均为0.21 μ g/100g。人每天由饮食可摄入10 μ g⁽⁹⁾,因此,正常人器官中也含锆,人体并不缺乏锆。目前,市售有机锆饮液中,某些产品Ge-132

浓度分别达0.4%、0.1%,若每日口服20mg,则可摄入80mg,20mg分别为人体正常摄入量的8000倍、2000倍,如此高剂量摄入Ge-132是否适合,很值得考虑。我们用Ge-132进行抗(SLRL)诱变时,并未见到1%高剂量组的抗诱变作用。提示不是剂量愈高抗诱变作用越显著。杨小奇等实验中Ge-132对几种诱变物诱发人胚或纤维母细胞体外培养的染色体畸变、姐妹染色单体交换的最佳抗诱变浓度也只有0.013mM,本实验中虽高剂量组的抗微核效应中300mg/kg组抑制率超过50%,但均未达到完全的抑制,提示我们不是万能的抗诱变剂。再者,虽Ge-132毒性很低,我们仍见到了少数动物和人使用Ge-132出现肾病变的报道,包括肾功能减退,血肌酐和尿毒氮异常升高等⁽²⁾。英国卫生部已颁布了关于取缔含锆制剂的通知。结合本研究及有关文献,认为服用锆必须十分慎重。对服用者严格随访观察以判断其对人体中的效果及副作用,对在人群中应用价值应提出确实证据。到目前为止尚未见有人群中服用锆的长期流行病学调研证据的支持。我们认为需先做出人群使用锆的适应症,禁忌症与常规方法和标准才能在人群中应用,对肾功能不健全的应立即明文禁止摄入Ge-132。建议有关部门加强对含锆制品及食品的管理,尤其不可混入无机锆以防止给消费者带来损害。

参考文献

1. Toru S, et al. Chronic tubulointerstitial changes induced by germanium dioxide in comparison with carboxyethylgermanium sesquioxide. *Kidney Int*, 1991; 40(5):882-90.
2. Okuda S, et al. *Current Therapeutic Res*, 1987; 41(2): 265.
3. Lee WR, et al. The sex-linked recessive lethal test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*, 1983; 123:183-279.
4. Goncharova RI, et al. A comparative study of the antimutagenic effects of antioxidants on chemical mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*, 1989; 214:257-265.
5. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. in: Kilbey BJ, et al. eds. *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. 2nd, Amsterdam: Elsevier, 1984; 93-140.
6. 蔡红英等. 卷心菜对鼠伤寒沙门氏菌回复突变的抑制作用. *癌变·畸变·突变*, 1992; 4(3):29-31.
7. 杨小奇等. 羧甲基锗倍半氧化物的抗诱变作用. *癌变·畸变·突变*, 1990; 2(1):5-8.
8. 刘明哲, 等. 41种中药的诱变作用及抗诱变研究. *癌变·畸变·突变*, 1992; 4(3):25-28.
9. 横山, 他グループマウムの食品中含有量C摂取量の推定. *日本卫生学杂志*, 1982; 37(1):202.

槐定的大鼠胚胎毒性和致畸性研究

宋永平 祝慧娟 滕素珍 黄幸纤
浙江医科大学毒理研究室 杭州 310031

摘要 Wistar大鼠于孕期d6-15ip槐定27、9、3mg/kg,结果高剂量组孕鼠平均增重减少,与阴性对照组相比,死胎率明显上升,胎鼠生长发育迟缓;中、低剂量组未见明显影响。各剂量组均未见畸形胎鼠。本研究结果表明,槐定27mg/kg(约为临床治疗剂量的27倍)对Wistar孕鼠具有胚胎毒性,但无致畸作用。

关键词 槐定;胚胎毒性;致畸作用

EMBRYOTOXICITY AND TERATOGENICITY STUDY OF SOPHORIDINE IN WISTAR RATS

Zhu Yongping, Zhu Huijuan, Teng Suzhen, Huang Xingshu
Zhejiang Medical University, Hangzhou 310006

Abstract The embryotoxicity and teratogenicity of sophoridine were investigated in Wistar rats. Sophoridine was administered at 27, 9, 3 mg/kg ip on day 6-15 of the gestation. As compared to the solvent control, high dosage of sophoridine (27mg/kg, about 27 times of clinical dosage) was toxic to pregnant rats and induced embryotoxicity, as measured by percentage of dead fetuses and delayed skeletogeny, No malformation of survival fetuses was ob-