

文章编号:1004 - 616X(2000)01 - 0023 - 05

## 全蝎乙醇粗提取物离体抗突变研究

吴金龙,王丽云

(江苏省卫生防疫站,江苏南京 210009)

**摘要:**目的:研究全蝎乙醇提取物是否具有抗突变效应。方法:本文利用沙门氏菌/微粒体致突变性试验,对全蝎和几味中药的乙醇粗提取物(简称全蝎乙醇提取物,SEE)的抗突变作用作了研究。结果:剂量在 25 - 100 $\mu$ l/皿时,SEE 对终致突变物敌克松(Dexon)诱发的 TA98 回复突变无明显影响;对终致突变物叠氮钠( $\text{NaN}_3$ )诱发的 TA100 回复突变也无明显影响。但在同样剂量下,SEE 能明显抑制间接致突变物 2 - 氨基苄(2 - AF)诱发的 TA98 回复突变。SEE 剂量为 25 $\mu$ l/皿、50 $\mu$ l/皿和 100 $\mu$ l/皿,2 - AF 为 15 $\mu$ g/皿时,TA98 的相对回复突变菌落数分别为 1985  $\pm$ 483、1232  $\pm$ 176 和 792  $\pm$ 170,与阳性对照组值 3182  $\pm$ 784 相比,分别具有显著( $P < 0.05$ )和极显著( $P < 0.01$ )差异;相对回复突变菌落数的抑制率分别为 38.06%、61.90%和 75.11%。显而易见,抑制率的增高取决于 SEE 的剂量。结论:这些结果表明 SEE 很可能是一种 2 - AF 的抑制剂。SEE 对 2 - AF 的抗突变作用,可能主要归咎于对  $S_9$  混合物的影响。

**关键词:**全蝎乙醇提取物;抗突变性;沙门氏菌/微粒体致突变性试验;2 - 氨基苄

中图分类号:R151.4<sup>+</sup>1 文献标识码:A

## STUDY ON IN VITRO ANTIMUTAGENICITY OF ETHANOL EXTRACT OF SCORPION

WU Jin-long, WANG Li-yun

(Jiangsu Provincial Anti-epidemic and Hygienic Station, Nanjing 210009, China)

### 参考文献:

- 1 陈善荣. 县域经济可持续发展之路 J. 环境保护, 1997, 5: 41 - 44.
- 2 耿昌友, 李茂森, 朱阳春, 等. 扬中市 1991 - 1994 年恶性肿瘤发病调查研究 J. 中国肿瘤, 1995, 4(10): 35 - 36.
- 3 苏德隆. 饮水与肝癌 J. 中华预防医学杂志, 1980, 14(2): 65 - 67.
- 4 “地面水污染对健康影响”课题协作组. 地面水污染与恶性肿瘤死亡关系调查 J. 卫生研究, 1989, 18(4): 20 - 23.
- 5 杨辉, 王洪庆, 嵇庆, 等. 蚕豆根尖微核试验法监测土壤污染的研究 J. 农业环境保护, 1997, 16(1): 20 - 23.
- 6 陶友荣. 消化道癌高发区塘水及井水对蚕豆根尖微核的致突变效应 J. 环境与健康杂志, 1997, 14(3): 134 - 137.
- 7 杨树勤. 卫生统计学 M. 北京: 人民卫生出版社, 1994.
- 8 王民生, Schmezer P. 碱性单细胞微量凝胶电泳测试技术简介 J. 癌变 畸变 突变, 1996, 8(2): 112 - 115.
- 9 Collins AR, Ma AG, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells J. *Mutat Res*, 1995, 336: 69 - 77.
- 10 Gedir CM, Ewen SWB, Collins AR. Single cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV - C damage and its repair in human cells J. *Int J Rad Bio*, 1992, 62: 313 - 317.
- 11 Tafazoli, Kirsch - Volders M. In vitro mutagenicity and genotoxicity study of 1,2 - dichloroethylene, 1,1,2 - trichloroethane, 1,3 - dichloropropane, 1,2,3 - trichloropropane and 1,1,3 - trichloropropene, using the micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis technique in human lymphocytes J. *Mutat Res*, 1996, 371: 185 - 202.
- 12 Goethem FV, Lison D, Kirsch - Volders M. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt - tungsten carbide J. *Mutat Res*, 1997, 392: 31 - 34.

收稿日期:1998 - 11 - 22;修订日期:1999 - 04 - 23

作者简介:吴金龙(1940 - ),男,江苏锡山市人,主任医师,学士,研究方向:卫生毒理学及保健食品。

**Abstract : Purpose and Methods :** Antimutagenicity of ethanol extract of scorpion and some Chinese medicinal herbs(SEE) was investigated using a *Salmonella typhimurium*/ mammalian microsome assay in the paper. Results :At 25 - 100 $\mu$ l/plate , SEE had no effect on TA98 revertants induced by the ultimate mutagen , Dexon and neither on TA100 revertants by the ultimate mutagen , sodium azide (NaN<sub>3</sub>) . But the revertants of TA98 induced by promutagen , 2 - aminofluorence(2 - AF) was significantly inhibited by SEE at same dosage. The relative revertants of TA98 were 1985  $\pm$ 483、1232  $\pm$ 176 and 792  $\pm$ 170 respectively at 25 $\mu$ l/plate , 50 $\mu$ l/plate and 100 $\mu$ l/plate of SEE with 15 $\mu$ g/plate of 2 - AF. In comparasion with positive control (3182  $\pm$ 784) , the relative revertants at 25 $\mu$ l/plate、50 $\mu$ l/plate and 100 $\mu$ l/plate had significant and very significant statistical difference ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ ) and the inhibitory percentages of the relative revertants were 38.06 % , 61.90 % and 75.11 % respectively. It was obvious that the increase of inhibitory percentages depended upon the dose of SEE.

**Conclusion :** These results indicated that SEE was a possible inhibitor of 2 - AF. Antimutagenicity of SEE toward 2 - AF could be attributed primarily to the effect of SEE on S<sub>9</sub> mixture.

**Key words :** ethanol extract of scorpion ; antimutagenicity ; 2 - aminofluorence ; *Salmonella typhimurium* / mammalian microsome assay

根据致癌过程的体细胞遗传物质基因突变理论<sup>1</sup>,寻找抗突变物预防肿瘤的工作,受到人们的普遍关注<sup>2</sup>。在体实验研究表明,SEE具有抗环磷酰胺诱发微核的作用<sup>3</sup>,本研究旨在观察SEE的离体抗突变作用,据此,作者利用Ames试验<sup>4</sup>进行了这方面的工作,现报道如下。

## 材料与amp;方法

1 SEE 将全蝎、薏米、木瓜和红花,分别用优质曲酒提取,提取液按比例兑制,用蒸馏水稀释至酒度为20 $\text{^\circ}$ (酒度系数20时,乙醇在酒中的容量百分数)。

## 2 试剂

2.1 阳性物 2 - AF分析纯德国产,NaN<sub>3</sub>分析纯和Dexon工业品国产。

2.2 试剂 牛肉粉和蛋白胨英国产,6 - 磷酸葡萄糖美国产,琼脂、二甲亚砷(DMSO)(AR)和生物素日本产,其余试剂除多氯联苯为工业品外均为分析纯,国产。

3 抗Ames试验 以Maron和Ames建立的沙门氏菌/微粒体致突变性试验<sup>4</sup>为基础,按卫生部修改的方法<sup>5</sup>进行。所用菌株为TA98和TA100,每种测试设平行样3个,共测2次。

## 3.1 SEE抑制致突变物对测试菌株致突变性试验

通常使用平板掺入法进行,只在研究方法对抑制率影响时才同时还使用预保温法。具体操作按表1实施。

表1 SEE抑制阳性物致突变性试验的操作步骤

移入物	对照管			受试物管		
	阴性	溶剂	阳性物	低剂量	中剂量	高剂量
S <sub>9</sub> 混合液 <sup>a</sup> 或PB <sup>b</sup> (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
不同浓度的SEE <sup>c</sup> (ml)				0.1	0.1	0.1
阳性物 <sup>d</sup> (ml)			0.1	0.1	0.1	0.1
双蒸水(ml)	0.1					
DMSO(ml)	0.1	0.1				
20 $\text{^\circ}$ 优质曲酒(ml)		0.1	0.1			
过夜培养菌(ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

立即(平板掺入法)或37 $\text{^\circ}$ 震荡培养20min(预保温法)后加入顶层琼脂,混匀浇底层葡萄糖琼脂平板,37 $\text{^\circ}$ 培养48h,计点回变菌落数。

a. S<sub>9</sub>含量为10% ; b. 0.2mol/L磷酸盐缓冲液pH7.4 ; c. SEE用20 $\text{^\circ}$ 优质曲酒作0.2和4倍稀释 ; d. 均用DMSO溶解。

## 3.2 SEE直接灭活致突变物或其代谢产物试验

按表1的要求设管和操作,但在加过夜培养菌前,将管内液体混匀,37 $\text{^\circ}$ 震荡保育20min,再加过夜培养菌和顶层琼脂,混匀后浇底层葡萄糖琼脂平板,37 $\text{^\circ}$ 培养48h,计点回变菌落数。

## 4 活菌计数

4.1 SEE抑制致突变物对测试菌株致突变性试验的活菌计数 按表1的操作进行,不经过夜培养菌原液,改加用0.2mol/LPB(pH7.0)作10<sup>6</sup>倍稀释后的过夜培养菌,然后加顶层、混匀后倒入营养琼脂平板内,37 $\text{^\circ}$ 培养24h,计点活菌菌落数。

4.2 SEE直接灭活致突变性试验的活菌计数 按3.2

所述方法操作,并作如下改动:不用过夜培养菌原液,改用  $10^6$  倍稀释后的过夜培养菌;底层葡萄糖琼脂平板改用营养琼脂平板;培养 48h 改为 24h;计点回变菌落改为计点活菌菌落数。

### 5 相对回变菌落数及抑制率的计算

5.1  $A(\%) = B/C \times 100\%$ , 式中 A - 相对活菌菌落形成率; B - 实验管活菌菌落数; C - 溶剂对照管活菌菌落数或空白对照管活菌菌落数(后者只在求溶剂对照管 C 时才用到)。

5.2  $D = E/A$ , 式中 D - 相对回变菌落数; E - 实验管实测回变菌落数。

5.3  $F(\%) = (G - H)/(G - I) \times 100\%$ , 式中 F - 抑制率; G - 阳性物对照管相对回变菌落数; H - 受试物管相对回变菌落数; I - 溶剂对照管相对回变菌落数。

6 阳性抗突变效果判断标准 在相对菌落数经单因素方差分析及两两比较后,再按表 2 的标准判断受试物抗突变效果。

**Table 2 The judged standard for the effect of positive antimutation**

inhibition (%)	intensity of antimutation effect
0 - 20	negative (-)
20 - 40	weak positive (+)
40 - 60	positive (#)
60 - 90	strong positive (##)
> 90	dubious toxicity (T)

## 结果与讨论

### 1 SEE 抑制致突变物对测试菌的致突变作用

1.1 平板掺入法和预保温法对 SEE 抑制 2 - AF 诱发 TA98 回复突变的影响 见图 1。由图可见,两种方法测得的抑制率均随剂量增高而增高。剂量在  $25\mu\text{l}/\text{皿}$  时,预保温法测得的抑制率稍高于平板掺入法;  $50\mu\text{l}/\text{皿}$  和  $100\mu\text{l}/\text{皿}$  时,情况则相反,但相同剂量下两种方法测得的抑制率,经 *t* 检验无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。同时,这两种方法的剂量 (*X*) 和抑制率 (*Y*) 的回归方程,前者为  $Y = 32.72 + 0.43X$ , 后者为  $Y = 28.72 + 0.51X$ , 经统计<sup>[6]</sup>未发现这两种方法的 *X* 和 *Y* 之间的关系有显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 可见这两种方法测得的抑制率无明显差异。为了方便起见,本文使用平板掺入法研究 SEE 抑制致突变物对测试菌的致突变作用。

1.2 SEE 抑制 2 - AF 诱发 TA98 回复突变的作用, 见表 3。

由表可见,受试剂量在  $25\mu\text{l}/\text{皿}$  和  $50\mu\text{l}/\text{皿}$ 、 $100\mu\text{l}/\text{皿}$  时,各受试物组的相对回复突变菌落数,与阳性对照值相比,分别具有显著 ( $P < 0.05$ ) 和极显著 ( $P < 0.01$ ) 性差异,其相应的回复突变抑制率分别为 38.06%、61.90% 和 75.11%, 可见具有良好的剂量-效应关系。已知 2 - AF 是为间接致突变物,需经代谢活化成终致突变物后,才能诱发 TA98 的回复突变<sup>4</sup>。可见 SEE 具有抗 2 - AF 间接致突变物诱发突变的作用。根据表 1 判断标准,SEE 的抗突变效果为强阳性。

**Table 3 Inhibition of SEE to TA98 revertants induced by 2 - AF with S9**

group	dose		survivors per plate	revertants per plate	relative revertants per plate	% of inhibition
	SEE ( $\mu\text{l}/\text{p.}$ )	2 - AF ( $\mu\text{g}/\text{p.}$ )				
negative control	0	0	177 $\pm$ 12			
medium control	0	0	181 $\pm$ 11	34 $\pm$ 4	32 $\pm$ 4	
SEE	25	15	174 $\pm$ 12	1908 $\pm$ 464	1985 $\pm$ 482 *	38.00 $\pm$ 9.25
SEE	50	15	202 $\pm$ 34	1398 $\pm$ 196	1232 $\pm$ 176 **	61.90 $\pm$ 8.84
SEE	100	15	198 $\pm$ 5	866 $\pm$ 186	792 $\pm$ 170 **	75.11 $\pm$ 16.12
Positive control	0	15	180 $\pm$ 12	3165 $\pm$ 780	3182 $\pm$ 784	

\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$

1.3 SEE 对 Dexon 和  $\text{NaN}_3$  诱发测试菌回复突变的影响

见表 4 和表 5。由此两表可见,剂量在 25 -  $100\mu\text{l}/\text{皿}$  时,SEE 对直接致突变物 Dexon 诱发 TA98

回复突变菌落数的相对值和对直接致突变物  $\text{NaN}_3$  诱发 TA100 回复突变菌落数的相对值,与相应阳性对照值之间,无显著性差异 ( $P > 0.05$ ),且它们的回复突变菌落抑制率分别在  $-5.33 \sim 9.20\%$  和  $0.82 \sim$

$4.32\%$  之间,表明 SEE 对 Dexon 和  $\text{NaN}_3$  诱发的回复突变无抑制作用,提示 SEE 对直接致突变物诱发的突变可能无抑制作用。

**Table 4 The effect of SEE on TA98 revertants induced by Dexon without S9**

group	dose		survivors per plate	revertants per plate	relative revertants per plate	% of inhibition
	SEE ( $\mu\text{l/p.}$ )	Dexon ( $\mu\text{g/p.}$ )				
negative control	0	0	175 $\pm$ 10			
medium control	0	0	179 $\pm$ 9	44 $\pm$ 6	43 $\pm$ 6	
SEE	25	50	168 $\pm$ 11	1394 $\pm$ 54	1486 $\pm$ 58	- 5.33 $\pm$ 0.21
SEE	50	50	193 $\pm$ 13	1431 $\pm$ 12	1327 $\pm$ 11	6.28 $\pm$ 0.05
SEE	100	50	190 $\pm$ 15	1367 $\pm$ 32	1287 $\pm$ 30	9.20 $\pm$ 0.22
positive control	0	50	182 $\pm$ 10	1437 $\pm$ 36	1413 $\pm$ 36	

**Table 5 The effect of SEE on TA100 revertants induced by  $\text{NaN}_3$  without S9**

group	dose		survivors per plate	revertants per plate	relative revertants per plate	% of inhibition
	SEE ( $\mu\text{l/p.}$ )	$\text{NaN}_3$ ( $\mu\text{g/p.}$ )				
negative control	0	0	161 $\pm$ 14			
medium control	0	0	163 $\pm$ 7	166 $\pm$ 2	164 $\pm$ 2	
SEE	25	1.5	162 $\pm$ 10	1088 $\pm$ 188	1095 $\pm$ 189	4.32 $\pm$ 0.74
SEE	50	1.5	164 $\pm$ 9	1064 $\pm$ 139	1058 $\pm$ 138	8.12 $\pm$ 1.06
SEE	100	1.5	161 $\pm$ 7	1115 $\pm$ 252	1129 $\pm$ 255	0.82 $\pm$ 0.18
positive control	0	1.5	149 $\pm$ 17	1039 $\pm$ 241	1187 $\pm$ 264	

2 SEE 直接灭活 2 - AF 或其代谢产物的作用 见表 6。由该表可见剂量在  $25\mu\text{l}/\text{皿}$ 、 $50\mu\text{l}/\text{皿}$ 、 $100\mu\text{l}/\text{皿}$  时,TA98 回复突变的抑制率分别为  $47.29\%$ 、 $61.70\%$  和  $71.91\%$ ,与表 3 中相应数据十分接近。两表对应的相对回复突变菌落数经  $t$  检验,无显著的统计学差异 ( $P > 0.05$ ),且两条回归直线的统计处理,未揭示抑制作用和直接灭活作用的剂量对抑制率的影响有显著差异 ( $P > 0.05$ )。测定 SEE 对 2 - AF 直接灭活作用的方法与测定 SEE 抑制 2 - AF 诱发回复突变作用的方法,不同点只是前者在加过夜培养菌前,将 SEE 与 2 - AF、S9 混合液混匀后  $37^\circ\text{C}$  保育 20min,这样 SEE 在浓度相对增高(未加菌液的关系)的条件下,在  $37^\circ\text{C}$  下与 2 - AF 的作用时间延长了

20min。这时如存在 SEE 对 2 - AF 及其代谢产物的直接灭活作用,各剂量下的 TA98 回复突变抑制率理应比表 3 中的数据普遍有所提高,但实际不然。可见 SEE 直接灭活 2 - AF 的可能性不大。

3 SEE 对活菌数的影响 见表 3 - 6。由这些表可见,每次实验的受试物组、阳性对照组、溶剂对照组及阴性对照组的活菌数十分接近,无统计学差异 ( $P > 0.05$ ),表明在受试条件下,SEE 对活菌数无明显影响。活菌数的多少直接影响到致突变物的致突变效果<sup>4</sup>,进而将会影响到抗突变效果和结果的判断,因此,在抗突变试验中,进行活菌计数十分必要。本文各实验条件下的活菌计数值均在  $1 - 2 \times 10^9$  个/ml,符合 Ames 试验要求。

**Table 6 The direct inactivity of SEE to 2 - AF or its metabolite with S9**

group	dose		survivors per plate	revertants per plate	relative revertants per plate	% of inhibition
	SEE	2 - AF				
	( $\mu$ l/p.)	( $\mu$ g/p.)				
negative control	0	0	186 $\pm$ 6			
medium control	0	0	184 $\pm$ 7	34 $\pm$ 6	34 $\pm$ 6	
SEE	25	15	190 $\pm$ 9	2167 $\pm$ 460	2098 $\pm$ 445 *	47.29 $\pm$ 10.03
SEE	50	15	197 $\pm$ 14	1620 $\pm$ 94	1513 $\pm$ 886 **	61.70 $\pm$ 3.59
SEE	100	15	197 $\pm$ 10	1177 $\pm$ 62	1099 $\pm$ 580 **	71.92 $\pm$ 3.80
positive control	0	15	182 $\pm$ 7	3973 $\pm$ 356	4017 $\pm$ 360	

\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$

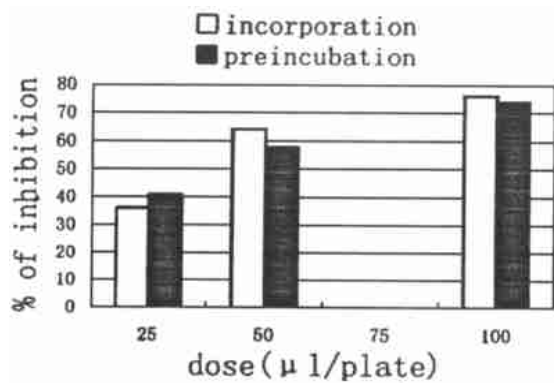


Figure 1 the effect of methods on % of inhibition

综上所述,SEE 对所用的直接致突变物的致突变性无抑制作用,对间接致突变物 2 - AF 诱发的 TA98 回复变具有依剂量的抑制作用,抑制率最高达 75.11%。根据抗突变效果判断标准<sup>2</sup>,SEE 的抗突变作用强度为强阳性。SEE 的抗突变作用,除了与全蝎有关外<sup>7</sup>,还可能与薏米、木瓜有关<sup>8~10</sup>。

作者既往的在体实验揭示,SEE 具有抗间接致突变物环磷酸胺诱发微核的作用<sup>3</sup>,结合本实验结果,SEE 抗突变机制与酒度无关,因为不同浓度 SEE 受试液是用 20 优质曲酒稀释的,而计算相对回变菌落数各管所含 20 优质曲酒量相等(见材料和方法),因此,SEE 抗突变机制可能与茶叶抑制间接致突变

物致突变性的机制一样,主要是其与微粒体酶的相互作用有关<sup>11</sup>。

#### 参考文献:

- 1 陈祖辉,张湘桥. 环境致突变物-致癌物生物学短期试验 M. 北京:人民卫生出版社,1982.18 - 20.
- 2 韩锐. 肿瘤化学预防及药物治疗 M. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1991.112 - 113.
- 3 吴金龙,王丽云,石根勇. 蝎圣宝酒致突变及抗微核作用研究 J. 中国食品卫生杂志,1996,8(5):8 - 10.
- 4 Maron DM, Ames BN. Revised methods for the salmonella mutagenicity test J. *Mutat Res*, 1983,113:173 - 215.
- 5 卫生部. 保健食品功能学评价程序和方法 Z. 北京:卫生部,1996.63 - 67.
- 6 中国科学院数学研究所数理统计组. 回归分析方法 M. 北京:科学出版社,1975.36 - 41.
- 7 马超良,李丁,王磊石,等. 全蝎提取液抗突变性研究 J. 癌变·畸变·突变. 1995,7(4):222 - 223.
- 8 江苏新医学院. 中药大辞典(上册) M. 上海:上海科技出版社,1977.349 - 351.
- 9 江苏新医学院. 中药大辞典(下册) M. 上海:上海科技出版社,1977.2645 - 2647.
- 10 金有景. 抗癌食药本草(上卷) M. 北京:中国食品出版社,1989.6 - 12.
- 11 Chen Hui-yin, Yen Gow-chin. Possible mechanisms of antimutagens by various teas as judged by their effects on mutagenesis by  $\alpha$ -amino-3-methylimidazo(4,5-f)-quinoline and benzo(a) pyrene J. *Mutat Res*, 1997,393(1,2):115 - 122.