

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 μ 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(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 μ l/皿、50 μ l/皿和100 μ l/皿,2-AF为15 μ 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S₉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⁺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 cellsJ. *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 cellsJ. *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 lymphocytesJ. *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 carbideJ. *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 μ 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 (NaN₃) . 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 μ l/plate , 50 μ l/plate and 100 μ l/plate of SEE with 15 μ g/plate of 2 - AF. In comparasion with positive control (3182 \pm 784) , the relative revertants at 25 μ l/plate、50 μ l/plate and 100 μ 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 S₉ 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¹,寻找抗突变物预防肿瘤的工作,受到人们的普遍关注²。在体实验研究表明,SEE具有抗环磷酰胺诱发微核的作用³,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⁴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 ^\circ (酒度系数20 ^\circ 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,NaN₃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⁴为基础,按卫生部修改的方法⁵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 ₉ 混合液 ^a 或PB ^b (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
不同浓度的SEE ^c (ml)				0.1	0.1	0.1
阳性物 ^d (ml)			0.1	0.1	0.1	0.1
双蒸水(ml)	0.1					
DMSO(ml)	0.1	0.1				
20 ^\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 ^\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 ^\circ 培养48h,计点回变菌落数。

a. S₉含量为10%;b. 0.2mol/L磷酸盐缓冲液pH7.4;c. SEE用20 ^\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 ^\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 ^\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10⁶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 ^\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^[6]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⁴。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 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 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 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 NaN_3 without S9

group	dose		survivors per plate	revertants per plate	relative revertants per plate	% of inhibition
	SEE ($\mu\text{l/p.}$)	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°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°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⁴,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				
	($\mu\text{l/p.}$)	($\mu\text{g/p.}$)				
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	

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

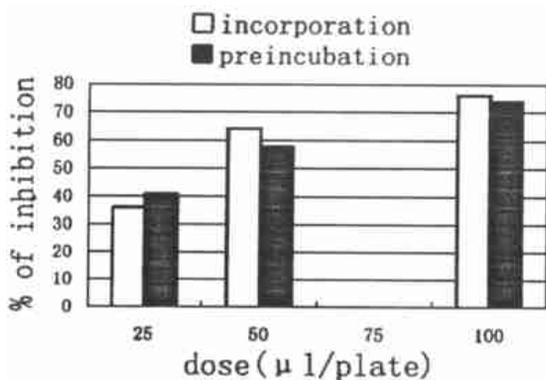


Figure 1 the effect of methods on % of inhibition

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²,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⁷,还可能与薏米、木瓜有关^{8~10}。

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³,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¹¹。

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 α -amino-3-methylimidazo(4,5-f)-quinoline and benzo(a) pyrene J. *Mutat Res*, 1997,393(1,2):115 - 122.