

文章编号: 1004-616X(2003)01-0035-03

·检测研究·

体外培育牛黄的诱变性研究

徐以平, 宋瑞琨, 石年*, 李龙

(华中科技大学同济医学院公共卫生学院卫生毒理学系, 湖北 武汉 430030)

【摘要】目的: 对体外培育牛黄的诱变性进行研究。方法: 采用 Ames 试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验、人外周血淋巴细胞体外培养染色体畸变试验等方法进行检测。结果: Ames 试验在 1 250、5 000、10 000 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 的浓度范围内, 各浓度组 MR 值在加代谢活化剂 S_9 和不加代谢活化剂 S_9 两种情况时均未超过 2; 微核试验在 50、150、500 mg/kg 3 个剂量水平, 各剂量组的微核率均数及 PCE/NCE 比值与空白对照组比较均未见显著性差异 ($P > 0.05$); 人外周血淋巴细胞体外培养染色体畸变试验在样品浓度为 1、10、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (不加代谢活化剂, - S_9) 和 1、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (加代谢活化剂, + S_9) 两种情况下, 各处理组测得的细胞畸变率与空白对照组比较均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 体外培育牛黄在所给剂量范围进行的 3 种诱变性试验结果均为阴性。

【关键词】 体外培育牛黄; 诱变性; 染色体畸变

中图分类号: R994

文献标识码: A

STUDY ON MUTAGENICITY OF CULTURED CALCULUS BOVIS

XU Yi-ping, SONG Rui-kun, SHI Nian, *et al.*

(Department of Health Toxicology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

【Abstract】 Purpose: To study the mutagenicity of Cultured Calculus Bovis. Methods: The studies were conducted with Ames test, micronuclei test and *in vitro* chromosome aberration test on human lymphocyte. Results: The results of Ames test showed no mutagenic effects with the concentration ranged from 1 250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ to 10 000 $\mu\text{g}/\text{plate}$. In micronuclei test, the mice orally received 50, 150, 500 mg/kg respectively per day for 2 days, no mutagenic effects were observed; and no significant reduction was observed on PCE/NCE ratio, compared with that of the negative control group ($P > 0.05$). The *in vitro* chromosome aberration test on human lymphocyte showed a negative result with the sample concentration ranged from 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Conclusion: No mutagenicity was found with Cultured Calculus Bovis in this experimentation.

【Key words】 Cultured Calculus Bovis; Mutagenicity; Chromosome aberration

牛黄是名贵中药之一, 天然牛黄产量已远不能满足需求。体外培育牛黄^[1-3]是利用体外培养方法获得的天然牛黄代用品, 经临床应用证实其药理作用^[4]与天然牛黄^[5]十分接近。为体外培育牛黄的毒理学评价提供毒性资料, 本文通过对 Ames 试验、微核试验

和人外周血淋巴细胞染色体畸变分析等 3 项试验终点进行观察, 对其诱变性进行了研究。现报道如下:

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2002-07-10; 修订日期: 2002-08-23

作者简介: 徐以平(1965-), 男, 湖北武汉人, 硕士, 主要从事遗传毒理及免疫毒理研究。

*通讯作者: Email: shi-nian@sohu.com

体外培育牛黄为棕黄色粉末,由华中科技大学同济医学院附属同济医院基础外科研究室提供; Ames 试验标准菌株 TA₉₇、TA₉₈、TA₁₀₀ 和 TA₁₀₂,由美国 Ames 实验室提供; 普通级昆明种小鼠,体重 18~24 g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,动物合格证号:19-050;健康人外周血,由华中科技大学同济医学院附属同济医院血库提供。

1.2 方法

1.2.1 Ames 试验^[6] 选用 Ames 试验标准菌株组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 TA₉₇、TA₉₈、TA₁₀₀ 和 TA₁₀₂,各试验菌株经 his⁻、UViB、ifa、R 因子、PAQI 质粒、自发回变等 6 项性状鉴定合格后,在 37

120 r/min 条件下培养 10 h,菌数达 1×10^9 /ml 方投入试验。采用标准平板法,在加 S₉ 和不加 S₉ 及 37 条件下培养 48 h 后观察结果。每个剂量设 3 皿平行培养。试验重复 1 次。代谢活化剂 S₉ 为本室自制的大鼠肝微粒体体外活化系统,制备后贮存于 -80 低温冰箱备用。体外培育牛黄的试验浓度为 1 250、5 000、10 000 μg/皿。阳性对照物为 2-氨基芴(2.5 μg/皿)。测定结果以 MR 值(MR = 诱发回复突变菌落均数/自发回复突变菌落均数)表示。结果判定:如试验组 MR ≤ 2,判定试验结果为阴性,否则判定试验结果为阳性。

1.2.2 微核试验^[7] 选取健康成年昆明种小鼠随机分为 5 组,每组 6 只。体外培育牛黄用蒸馏水溶解后按 50、150、500 mg/kg 的剂量,连续 2 天,每天 1 次经口灌胃给药,空白对照组和阳性对照组分别给予蒸馏水和环磷酰胺(ip. 30 mg/kg)。末次给药 6 h 后处死动物,取胸骨骨髓作涂片,固定,Gemsa 染色。油镜下每只动物的微核标本片观察 1 000 个嗜多染红细胞,记录出现微核的阳性细胞数,结果以微核细胞千分率(MNCF %)表示。为观察受试物可能对小鼠血细胞形成的抑制作用,另观察 200 个无核细胞,计算嗜多染红细胞(PCE)与正染红细胞(NCE)的比值,结果以 PCE/NCE 表示。

1.2.3 人外周血淋巴细胞染色体畸变试验^[8] 向盛有混合培养液(内含 RPMI1640 培养液 4.0 ml、灭活小牛血清 1.0 ml、PHA 0.8 mg、双抗各 500 单位)的培养瓶中加入肝素抗凝(0.1 μg/ml)的健康人外周血 0.3 ml,置 37 培养 4 h 后分别加入蒸馏水、不同浓度体外培育牛黄应用液、阳性对照物环磷酰胺(50 μg/ml)应用液各 100 μl。试验在加和不加大鼠肝微粒体体外活化系统(S₉, 50 μl/瓶)的条件下分

别进行。加样完毕后置 37 培养箱继续培养 48 h,加分裂抑制剂秋水仙素(终浓度为 0.1 μg/ml),4 h 后按常规方法收获细胞、制片、染色,油镜下每一处理样本至少分析 100 个完整的中期染色体分裂相,记录畸变阳性细胞数,结果以细胞畸变率(%)表示。

1.3 统计学分析

所有数据均以 Excel 统计分析软件进行统计分析。

2 结果与讨论

体外培育牛黄诱变性研究的试验结果分别见表 1、表 2、和表 3。

表1. 体外培育牛黄Ames试验结果(MR值)

Table 1. The MR values of Ames Test with cultured calculus bovis

Concentration / μg · plate ⁻¹	TA ₉₇		TA ₉₈		TA ₁₀₀		TA ₁₀₂	
	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉	- S ₉
1 250	0.68	0.22	0.93	0.74	1.14	0.71	0.50	0.46
5 000	0.70	0.60	1.78	1.68	1.04	1.01	0.82	0.90
10 000	0.94	1.07	1.16	0.47	0.84	0.74	0.69	0.96
positive control (2-AF)			25.53	10.62	11.42	2.96		

表2. 体外培育牛黄小鼠微核试验结果

Table 2. The results of micronuclei test on mice with Cultured Calculus Bovis

intake level / mg · kg ⁻¹	numbers of mice	cell numbers of observation	MNCF (%, $\bar{x} \pm s$)	PCE/NCE ($\bar{x} \pm s$)
negative control	6	6 000	2.00 ± 0.82	2.04 ± 0.51
50	6	6 000	1.00 ± 0.58	2.15 ± 0.81
150	6	6 000	2.00 ± 0.58	2.03 ± 0.72
500	6	6 000	1.17 ± 1.07	1.69 ± 0.62
positive control	6	6 000	15.20 ± 5.27*	0.73 ± 0.21*

*compared with negative control, $P < 0.01$

如表所示,在体外培育牛黄的试验浓度为 1 250、5 000、10 000 μg/皿的剂量条件下,其 MR 值在加代谢活化剂 S₉ 和不加代谢活化剂 S₉ 两种情况时均未超过 2, Ames 试验结果为阴性。体外培育牛黄在 50、150、500 mg/kg 3 个剂量水平,各剂量组的微核细胞率均数及 PCE/NCE 比值与空白对照组比较均未见显著性差异 ($P > 0.05$),表明体外培育牛黄在上述剂量条件下经口染毒后在小鼠骨髓嗜多染红细胞未引起微核细胞率的显著升高,亦未见其对骨髓细胞分裂的抑制作用。人外周血淋巴细胞体外培养染色体畸变试验结果表明,体外培育牛黄在样品浓

度为 1、10、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (不加代谢活化剂, - S_9) 和 1、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (加代谢活化剂, + S_9) 两种情况下, 各处理组测得的细胞畸变率与空白对照组比较均无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明体外培育牛黄在体外试验条件下不引起人外周血淋巴细胞染色体畸变率的显著升高。

表3. 体外培育牛黄人外周血淋巴细胞染色体畸变试验结果

Table 3. The results of in vitro chromosome aberration test on human lymphocyte with Cultured Calculus Bovis

Dosage	cell numbers of observation	cell numbers of aberration	rate of cell aberration (%)
negative control (- S_9)	500	5	1.00
1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (- S_9)	500	7	1.40
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (- S_9)	422	5	1.18
100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (- S_9)	389	5	1.29
negative control (+ S_9)	200	2	1.00
1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (+ S_9)	200	4	2.00
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (+ S_9)	200	3	1.50
positive control (+ S_9)	100	18	18.00*

*compared with negative control, $P < 0.01$

Ames 试验以组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 TA₉₇、TA₉₈、TA₁₀₀ 和 TA₁₀₂ 为试验对象, 用于检测受试物能否引起鼠伤寒沙门氏菌基因组碱基置换或移码突变, 其遗传终点是基因突变; 微核试验作为用于染色体损伤和干扰细胞有丝分裂的化学毒物的快速检测方法, 能检测化学毒物诱导产生的染色体完整性改变和染色体分离改变两种遗传学终点; 而人外周血淋巴细胞染色体畸变试验方法在体外直接以

人体细胞为实验对象, 观察化学毒物对分裂增殖中的人淋巴细胞染色体可能造成的损伤。以上 3 种实验方法的检测终点既包括基因突变, 又涉及染色体损伤, 而实验对象又包含了从细菌、动物到人的不同种类的生物体细胞, 其试验结果应能较全面地反映受试的诱变活性。以上 3 项试验结果提示在本试验条件下, 体外培育牛黄的诱变性试验结果为阴性。

参考文献:

- [1] 俞长芳. 人工培育牛黄的研究概况[J]. 中草药, 1983, 14(5): 43-44.
- [2] 于昌松, 蔡红娇, 巴秀云, 等. 应用人类胆囊结石形成理论制造牛黄[J]. 武汉医学院学报, 1985, 14(1): 1-3.
- [3] 于昌松, 夏穗生, 蔡红娇. 人工体外创制胆固醇结石的实验研究[J]. 实验外科杂志, 1984, 1(1): 4-8.
- [4] 杜佐华, 蔡红娇, 杨荣光, 等. 体外培育牛黄抗炎作用的实验研究[J]. 中药新药与临床药理, 1996, 7(1): 27-29.
- [5] Kimura M. Fundamental research for the pharmacological activity of oriental drugs: Combined effect of animal origin drugs on the inhibition of leukocyte migration and their effective components[J]. Yakugaku Zasshi, 1978, 98: 442-447.
- [6] 王家玲. 环境微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1988. 154-163.
- [7] 张桥. 卫生毒理学基础[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 252-254.
- [8] 黄幸经, 陈星若. 环境化学物致突变致畸致癌试验方法[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1985. 13-48.

征 订 启 事

《癌变·畸变·突变》现为季刊, 大 16 开, 64 页, 每季度第一个月的月末出版。2003 年起全面改版, 价格不变, 每期定价仍为 6 元, 全年 24 元。本刊刊号: ISSN 1004-616X, CN 44-1063/R。邮发代号: 4-548。全国各地邮局均可订阅。如邮局订阅延误, 可汇款至本刊编辑部补订。编辑部地址: 广东省汕头市新陵路 22 号汕头大学医学院内《癌变·畸变·突变》编辑部。邮政编码: 515031。电话: 0754-8900267。E-mail: cemsctm@stu.edu.cn

《癌变·畸变·突变》编辑部