

染料木素原料药的致突变性研究

许建宁¹,王全凯¹,王四旺²,孙纪元^{2*}

(1. 中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所,北京 100050; 2. 第四军医大学药物研究所,陕西 西安 710032)

摘要:目的 染料木素原料药致突变性研究 方法 采用鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验 (Ames 试验)、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验、小鼠睾丸精母细胞染色体畸变试验 结果 染料木素原料药各剂量组对鼠伤寒沙门氏菌株 TA₉₇, TA₉₈, TA₁₀₀, TA₁₀₂无诱变性;也无诱发小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率和睾丸精母细胞染色体畸变率增加的作用 (与溶剂对照组比较, $P > 0.05$) 结论 在本试验条件下,染料木素原料药无致突变作用。

关键词:致突变性; Ames 试验;微核试验;睾丸精母细胞染色体畸变试验;染料木素

中图分类号: R286.911 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)04-0353-03

Study on mutagenicity of genistein

XU Jian-ning¹, WANG Quan-kai¹, WANG Si-wang², SUN Ji-yuan²

(1. Institute for Occupational Health and Poisoning Control, China Center for Disease Prophylaxis and Control, Beijing 100050, China; 2. Institute of Materia Medica, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Key words mutagenicity; Ames test; micronucleus assay; spermatogonial chromosomal aberration test; genistein

骨质疏松症是中老年退行性重要疾病之一,在停经后或更年期妇女中尤为多见。染料木素原料药系从豆科植物槐角 *Sophora japonica* L. 的干燥成熟果实中提取的异黄酮单体成分,是具有弱雌激素样作用又非雌激素类化合物,称之为植物雌激素。大量的动物和人体试验结果已表明,其可防止骨质流失,增加骨密度^[1-4]。因此,染料木素极可能开发成为治疗骨质疏松症的有效药物,为了保证其安全使用,本研究从遗传毒理学方面采用鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验 (Ames 试验)、小鼠骨髓多染红细胞微核试验、小鼠睾丸精母细胞染色体畸变试验,研究染料木素原料药有无致突变作用。

1 实验材料

1.1 药物:染料木素原料药由第四军医大学药物研究所提供,纯度 > 98%。试验时,用二甲基亚砜 (DMSO) 或蒸馏水配成不同浓度的溶液备用。

1.2 菌株和实验动物:鼠伤寒沙门氏菌株 TA₉₇, TA₉₈, TA₁₀₀, TA₁₀₂由美国 Ames 实验室提供;肝微粒体酶 S₉(多氯联苯诱导)本实验室按 Ames 方法制备,本实验对两者进行鉴定符合各项生物学特性才进行试验。三级健康 NIH 或昆明种小鼠,由中国

药品生物制品检定所实验动物中心提供,动物合格证号为京动许字 (2000) 第 017 号。

1.3 主要试剂:2,4,7-三硝基-9-芴酮 (Fluka 公司),MMS (Merck 公司),2-羟基蒽醌和 2-AF (上海试剂厂),氧化型辅酶 II (Sigma 公司),6-磷酸葡萄糖钠盐 (Sigma 公司),环磷酰胺 (CY,上海华联制药有限公司),DMSO (北京试剂公司)

2 实验方法

2.1 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验 (Ames 试验):按 Maron 和 Ames^[5]修订标准,采用平板掺入法,在加和不加体外代谢活化系统 (S₉混合物) 条件下进行试验。试验设 5 个剂量组 (600, 300, 150, 75, 37.5 μ g/皿)、空白 (自发)、溶剂 (60 μ L 皿的 DMSO) 和阳性对照组。每剂量每次设 3 个平行培养皿,并按规定重复试验。计数每个平皿中的回变菌落数。

2.2 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验^[6]:经预试验,确定骨髓采样时间为受检样品作用 24 h。选用健康 NIH 种小鼠,体重 24~26 g,随机分为 7 组,每组 10 只动物 (雌雄各半)。5 个剂量组 (2500, 1250, 625, 312, 156 mg/kg) 和溶剂对照组 (20 mL/kg 蒸馏水) 采用 ig 给药,阳性对照组 ip 50 mg/kg

* 收稿日期:2002-10-28

作者简介:许建宁 (1965-),女,副研究员,硕士生导师,1993 年于北京师范大学获理学学士学位,2002 年于中国协和医科大学公共卫生学院获医学硕士学位。主要从事化学物致突变致癌机制和化学物安全性评价方面的研究及检测工作,专长为遗传毒理学。曾作为项目负责人和主要人员完成 4 项国家自然科学基金资助项目、2 项卫生部科学研究基金资助项目和 2 项其他部委研究基金资助的研究工作,已完成逾百个新药、农药等安全性评价工作。获得 1997 年卫生部医药卫生科技进步三等奖,1998 年中国预防医学科学院青年科技工作者奖,发表学术论文 30 余篇,参与 2 部著作编写。

Tel (010) 63153116 E-mail xujianing@yahoo.com

的 CY,于给药后 24 h 断颈处死动物,取胸骨骨髓按常规方法制片,Giemsa 染色,显微镜下观察 1 000 个多染红细胞 (PCE),计数含有微核的细胞数和正常红细胞 (NCE) 数,并计算多染红细胞和正常红细胞的比率 (PCE/NCE)。

2.3 小鼠睾丸精母细胞染色体畸变试验^[7]: 选用健康昆明种雄性小鼠,体重为 25~ 30 g,每组 5 只动物。试验时,连续 5 d 经口染毒,剂量为 2 500, 1 250, 625 mg/kg 同时,ip 40 mg/kg 的 CY 作为阳性对照;经口给予 20 mL/kg 蒸馏水作为溶剂对照。于第 1 次给药后 13 d 处死动物 (动物于处死前 4 h ip 6 mg/kg 的秋水仙素)。每只动物分别取出两侧睾丸,按常规方法制片,Giemsa 液染色。油镜下每只动物每侧睾丸观察 50 个中期分裂精母细胞,记录染色体畸变细胞数和畸变类型并计算畸变率。

3 实验结果

3.1 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验 (Ames 试验):

表 1 染料木素原料药 Ames 试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 ($\mu\text{g} \cdot \text{皿}^{-1}$)	TA ₉₇		TA ₉₈		TA ₁₀₀		TA ₁₀₂	
		- S ₉	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉
空白对照	-	121± 5	123± 6	38± 2	37± 2	125± 4	126± 7	310± 9	309± 9
DM SO	60	113± 4	117± 6	41± 2	40± 1	130± 7	132± 5	288± 8	302± 5
染料木素	600	116± 6	118± 7	42± 4	40± 2	136± 5	132± 6	292± 16	301± 8
	300	114± 4	120± 7	40± 5	38± 4	127± 5	140± 5	299± 14	294± 14
	150	119± 4	119± 4	43± 1	41± 3	138± 5	129± 6	289± 8	301± 6
	75	120± 8	128± 7	38± 3	38± 2	134± 4	132± 6	285± 8	295± 8
	37.5	110± 7	120± 6	39± 4	41± 2	129± 6	133± 4	297± 19	298± 10
阳性对照	*	① 1989	1151	① 2629	② 3871	③ 1943	② 2167	③ 3839	④ 1469

* ① 2, 4, 7-三硝基-9-芴酮, 0. 2 μ g/皿 ② 2-AF, 50 μ g/皿 ③ MMS, 30 μ L 原液/皿 ④ 2-羟基蒽醌, 80 μ g/皿
* ① 2, 4, 7-trinitro-9-fluorenone, 0. 2 μ g/plate ② 2-AF, 50 μ g/plate ③ MMS, 30 μ L/plate ④ 2-hydroxyanthraquinone, 80 μ g/plate

表 2 染料木素原料药对小鼠嗜多染红细胞微核率的影响

Table 2 Results of genistein for polychromatic erythrocyte micronucleus assay in mice

组别	剂量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	性别	观察 PCE 数/个	PCE/NCE	含微核细胞数/个	微核细胞率/%
对照	-	♀	5 000	1. 71	25	0. 500± 0. 122
	-	♂	5 000	1. 14	15	0. 300± 0. 071
染料木素 原料药	2 500	♀	5 000	1. 86	24	0. 480± 0. 110
	1 250	♀	5 000	1. 61	18	0. 360± 0. 134
	625	♀	5 000	1. 50	18	0. 360± 0. 114
	312	♀	5 000	1. 62	17	0. 340± 0. 114
	156	♀	5 000	1. 53	18	0. 520± 0. 110
	2 500	♂	5 000	1. 40	24	0. 480± 0. 084
	1 250	♂	5 000	1. 37	22	0. 440± 0. 114
	625	♂	5 000	1. 36	23	0. 460± 0. 089
	312	♂	5 000	1. 43	23	0. 460± 0. 114
	156	♂	5 000	1. 35	19	0. 380± 0. 084
CY	50	♀	5 000	1. 62	329	6. 580± 2. 450
	50	♂	5 000	1. 15	324	6. 480± 0. 773

与对照组比较: * $P < 0. 01$

* $P < 0. 01$ vs control group

在加与不加体外代谢活化系统 S 时,染料木素原料药对鼠伤寒沙门氏菌株 TA₉₇, TA₉₈, TA₁₀₀, TA₁₀₂ 的诱发回变菌落数均未超过自发回变菌落数的 2 倍;各剂量组回变菌落数与空白、溶剂对照比较无显著性差异 ($P > 0. 05$),表明试验结果为阴性。见表 1。

3.2 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验: 溶剂对照组微核细胞率与阳性对照组比较差异有显著性 ($P < 0. 01$)。染料木素原料药各剂量组的微核细胞率为 0. 36%~ 0. 52%,与溶剂对照组比较差异无显著性 ($P > 0. 05$),而显著低于阳性对照组 ($P < 0. 01$);各剂量组间无明显的剂量-反应关系,提示染料木素对小鼠骨髓无细胞毒性作用。见表 2。

3.3 小鼠睾丸精母细胞染色体畸变试验: 染料木素各剂量组的染色体畸变率为 2. 4%~ 2. 8%,与溶剂对照组比较差异无显著性 ($P > 0. 05$);且各剂量组细胞的畸变率均在正常范围内,表明染料木素原料药对小鼠睾丸精母细胞染色体无损伤作用。见表 3。

表 3 染料木素原料药对小鼠睾丸精母细胞染色体畸变率的影响

Table 3 Effect of genistein on spermatogonial chromosomal aberration test in mice

组 别	剂 量 /($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	动物数	观察细胞数 /个	染色体畸变细胞数 /个	畸变率 %
蒸馏水	—	5	500	9	1.80± 0.84
染料木素	2 500	5	500	14	2.80± 0.84
原料药	1 250	5	500	14	2.80± 0.84
	625	5	500	12	2.40± 0.55
CY	40	5	500	93	18.6± 2.07

与溶剂对照组比较: * $P < 0.01$

* $P < 0.01$ vs control group

4 讨论

本研究所选的 3 项试验从基因和染色体水平反映遗传物质受损伤情况,是国内外进行外来化合物遗传毒理学方面安全性评价的常做实验。每种体外短期检测系统均会受到实验条件(如有限的体外代谢活化系统)、实验设计、不同化合物的特殊性等因素影响,使试验结果存在一定比例的假阴性或假阳性的可能,任何一项遗传毒性试验中的阳性、阴性结果不能完全说明受试物是否具有致突变性,需结合遗传毒性方面的多项检测试验结果全面考虑,以提高对受试物是否具有诱变性及潜在致癌性评价的可靠性^[8]。因此,我们选择 Ames 试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验、小鼠睾丸精母细胞染色体畸变试验 3 个测试系统来研究染料木素原料药的致突变性。染料木素原料药经处理不完全溶于水及常用溶剂等特殊理化性质,影响体外培养细胞染色体畸变试验结果的稳定性和可靠性,因此,本研究依据《中药新药研究指南》^[9]要求选用哺乳动物生殖细胞染色体畸变试验以保证评价结果的相对可靠。

上述研究覆盖体内与体外两种试验方法,并以微生物和哺乳动物作为实验材料,从基因和染色体两种水平所获得的结果均表明:在本试验条件下,染料木

素原料药无致突变作用。为染料木素原料药进一步开发和利用提供遗传毒理方面的安全性实验资料。

References

[1] Chen H, Ni A M. The preventive effects of isoflavone on osteoporosis [J]. *Foreign Med Sci—Geriatrics* (国外医学·老年医学分册), 2000, 21 (1): 12-14.

[2] Yu W S. Research development in phyto-oestrogens [J]. *Foreign Med Sci—Hygiene* (国外医学·卫生学分册), 1999, 26 (2): 84-87.

[3] Arjmandi B H, Alekel L, Hollis B W, *et al*. Dietary soybean prevents bone loss in ovariectomised rat model of osteoporosis [J]. *J Nutr*, 1996, 126: 161-167.

[4] Wilcox G, Wahlavist M L, Burger H G, *et al*. Oestrogenic effects of plant foods in postmenopausal women [J]. *Br Med J*, 1990, 61: 651-661.

[5] Maron D M, Ames B N. Revised method for the Salmonella mutagenicity test [J]. *Mutat Res J*, 1983, 113: 173-215.

[6] Yuan B J, Wang Z Q. *Preclinical Safety Evaluation and Practice of Pharmaceuticals* (新药临床前安全性评价与实践) [M]. Beijing: Military Medical Science Publishing House, 1997.

[7] Qin C H. *Detection Methods of Mutagenicity and Carcinogenicity of Chemicals* (化学物致突变致癌检测技术) [M]. Urumqi: Xinjiang Medical Science and Technology Publishing House, 1996.

[8] Zhou H J. *International Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals (Safety Evaluation)* (药品注册的国际技术要求·安全性部分) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001.

[9] Ministry of Health, P. R. China. *Guideline on the Studies of the New Chinese Materia Medica* (中药新药研究指南) [S]. 1993.

山豆根碱抗炎作用的研究

谢世荣,黄彩云,黄胜英*

(大连大学医学院 药理教研室,辽宁 大连 116622)

摘要:目的 山豆根碱 (dauricine, DRC) 的抗炎作用研究。方法 采用组胺、醋酸对毛细血管通透性增高和二甲苯引起小鼠的炎性水肿;棉球植入大鼠皮下组织致肉芽组织增生和角叉菜胶致大鼠后爪水肿,肾上腺内抗坏血酸含量测定方法。结果 DRC 50, 100 mg/kg 对上述炎症模型与氢化可的松相似,均具有显著的抑制作用。肾上腺切除的大鼠,也具有同样的抗炎作用。相同剂量的 DRC 对正常大鼠的抗炎作用强于切除肾上腺大鼠。DRC 也降低肾上腺内抗坏血酸含量。结论 提示 DRC 既有直接抗炎作用,又有兴奋垂体-肾上腺皮质系统的间接抗炎作用。

* 收稿日期: 2002-06-27
作者简介: 谢世荣 (1952-),女,副教授,大连市药学会理事。