

• 综述 •

修订适合中药体外致突变性检验的 Ames 检测体系思路

金建玲*, 刘 波, 高培基*

(山东大学生命科学院 微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100)

摘 要: Ames 测验是遗传毒理实验(致畸致癌致突变)的初筛方法, 是食品药品安全性检验中心的必检项目之一。结合部分中药体外致突变性(Ames 检测)结果的混乱情况, 提出修订现行 Ames 检测体系的必要性和紧迫性。通过对生物类样品中因含有组氨酸成分对 Ames 测验结果的影响作用(易产生假阳性)进行深入分析, 并对目前国际上相关的 Ames 检测的修订方法进行综述和比较, 指出了目前国内外尚没有适合中药致突变性检验的修订体系。在此基础上, 提出了几条修订常规的 Ames 测验以适合中药体外致突变性检验的思路, 以期引起应有的重视。

关键词: Ames 检测; 致突变性; 中药; 修订

中图分类号: R285.53

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)07-1155-03

Thinking of revising Ames system suited to *in vitro* mutagenicity test for Chinese materia medica

JIN Jian-ling, LIU Bo, GAO Pei-ji

(State Key Laboratory of Microbial Technology, School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, China)

Key words: Ames test; mutagenicity; Chinese materia medica (CMM); revision

Ames 检测是国际上食品、药品及其他相关产品获得生产许可证之前必须进行的安全性检测项目之一, 通常作为遗传毒理实验(致畸致癌致突变)的初筛方法^[1~3]。目前我国的国家标准采用 2003 年修订版本(GB 15193-94.2003)。

Ames 检测是利用鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* 的组氨酸(histidine)营养缺陷型突变株(*his⁻*)发生回复突变的性质, 对化学物质致突变性进行初步筛选的短期体外实验方法。实验体系采用 4 株组氨酸缺陷的沙门氏菌作实验菌株, 组氨酸缺陷系由碱基置换和不同类型的移码突变造成。另外, 引入的深度粗糙突变型(*rfa*)有利于待测物能够更好地进入细菌细胞, 引入 DNA 损伤修复缺陷型(*uvrB*)有利于更加灵敏的检出待测物的致突变性。Ames 试验的常规方法有斑点试验和平板掺入试验。平板掺入试验可定量测试样品致突变性的强弱。此法较斑点试验敏感。平板掺入试验的流程主要包括: 一定量的组氨酸缺陷型细胞均匀分布在组氨酸限量的选择平板上, 其中加入的组氨酸量可保持涂布细胞有限次的细胞分裂(1~2 次), 在此过程中, 细菌细胞可发生自发或诱发突变成为原类型回复子, 从而能够在选择平板上形成肉眼可见的回复子菌落, 若添加待测物的实验组的回复子菌落数相比于阴性对照组高出 2 倍或以上, 而且回复子菌落数与待测物浓度有剂量依赖关系, 据此可以判定待测物 Ames 检测阳性, 即意味着具有潜在的致癌致畸的可能性^[4]。

1 Ames 检测的影响因素

Ames 检测最重要的影响因素是检测体系中的组氨酸及其前体物(如多肽、蛋白质等)的量^[5~8]。因为它们可以支持 *his⁻* 缺陷型细胞生长和分裂, 增加最终回复子菌落数, 而造成假阳性。因此, 现行的 Ames 检测体系不适合含组氨酸成分样品的致突变性检验。如食品、某些化妆品、中药水提物等。

2 Ames 检测的修订

国外文献报道的修订方法^[9~17]主要分为两类。第一类: 通过对样品预处理, 如通过萃取、色谱等技术, 去除组氨酸及其相关物, 仅保留有效成分^[10]。由于预处理可能造成中药的某些有效成分丢失, 预处理后中药样品的致突变性不能很好的代表原始中药的致突变性。因此, 此法不适合中药致突变性检测。第二类^[11,14,15]: 利用其他菌株(如大肠杆菌、夏威夷弧菌等)和其他突变(如抗性突变等), 避开组氨酸等成分对最终实验结果的影响。此类方法因为缺少国际性的标准操作指南, 各实验室间的实验结果缺乏可比性, 不适合世界范围内推广使用。因此, 修订 Ames 检测体系, 建立一套可以适合中药致突变性检验的方法, 有理论和实践双重意义。

3 Ames 检测体系及国家标准急需修订以适合中药致突变性检验

表 1 列举了部分文献报道的经 Ames 检测的中药^[18~40]。从结果中可以看出部分中药 Ames 测验结果相当紊乱, 且与哺乳动物骨髓细胞染色体畸变(或红细胞微核实验)及精子实验的结果的符合度也远低于化学物质(纯合物)

* 收稿日期: 2009-01-17

* 通讯作者 金建玲(1965—), 女, 副教授, 博士。研究方向为微生物遗传学、医学微生物学、中西药结合及细菌抗药性等。目前的研究工作集中在新型抗真菌抗生素的开发及中药致突变性检验等。

Fax: (0531) 88565610 Tel: (0531) 88369495 E-mail: jinjianling@sdu.edu.cn

表 1 部分经 Ames 检测的中药
Table 1 Some Chinese materia medica
tested by Ames method

中药	Ames	染色体畸变 或微核实验	精子实验
黄芪	+ 殷学军(1989)	+ 张春颖(2001)	
	- 赵泽贞(1991)	- 龚太平(1998)	
	- 刘明哲(1992)		
槐花	+ 殷学军(1989)	+ 殷学军(1989)	
		+ 张春颖(2001)	
		+ 董伟华(1991)	
红花	+ 渡到富士雄(1983)	+ 董伟华(1991)	
	- 殷学军(1989)	+ 殷学军(1989)	
	- 苗明三(2002)	+ 苗明三(2002)	
灵芝	+ 张建清(1999)	- 肖志勇(2006)	- 肖志勇(2006)
	- 肖志勇(2006)	- 陈新霞(1996)	- 陈新霞(1996)
	- 陈新霞(1996)		
冬虫夏草	+ 张建清(1999)	- 马继霞(1995)	- 马继霞(1995)
	- 刘明哲(1992)	- 孔祥环(1995)	- 孔祥环(1995)
	- 孔祥环(1995)	- 金少华(1997)	- 金少华(1997)
	- 金少华(1997)		
马兜铃酸	+ 郭晓昕(2005)	+ 郭晓昕(2005)	
	+ 谢大英(1987)	+ 谢大英(1987)	
		+ 苗明三(2002)	
马兜铃	- 陆华(2007)	+ 陆华(2007)	
银杏水提物	- 张卫明(2005)	- 张卫明(2005)	- 张卫明(2005)
	- 陈世伟(1999)	- 陈世伟(1999)	- 陈世伟(孕鼠 1999)
银杏醇提物	+ 吴金龙(1996)	- 吴金龙(1996)	
	- 陈世伟(1999)	- 陈世伟(1999)	

Ames 检测阳性与致畸致癌阳性符合率大于 90% 的水平。原因在于: 不经修订的 Ames 检测, 往往因为中药中含组氨酸成分而导致假阳性结果, 如灵芝和冬虫夏草。因此, 如何排除中药药液(尤其是水提物)中组氨酸等成分对实验结果的影响, 排除假阳性结果的出现, 提高 Ames 检测的结果与哺乳动物骨髓细胞染色体畸变实验(或红细胞微核实验)和精子实验检测结果, 及致癌性检测结果之间的符合度, 是遗传毒理检验中迫切需要解决的问题。

4 适合中药致突变性检验的 Ames 检测体系的修订思路

由于采用其他微生物和其他突变检测待测物的致突变性没有在国际上被广泛接受和推广使用, 因此本文将依据遗传学和遗传毒理学原理, 提出几条适合中药致突性检验的 Ames 检测体系的修订思路。

4.1 通过改变阴性对照体系, 排除待测样品中组氨酸对 Ames 测验结果的影响: 经典的 Ames 检测体系中根据实验组与阴性对照组回复子菌落数之比是否大于等于 2 来判定 Ames 检测是否为阳性。含中药的实验组中最终出现的回复子包含 3 个来源: 其一, 出发细胞利用检测培养基内限量的组氨酸进行生长和细胞分裂, 此过程中细胞所发生的自发回复由突变所致; 其二, 因为引入中药组分而导致测验体系中组氨酸量增加, 从而增加了出发细胞发生细胞分裂的次数, 进而增加因自发突变产生的回复子数目; 其三, 由于待测物的诱变作用所致。不难看出, 第一种来源的回复子数, 就是常规 Ames 检测中阴性对照组的回复子数。如果不对 Ames

检测体系加以修订, 第二种来源的回复子将不被区别地与第三种来源的回复子混为一谈, 都被误认为是中药诱变作用所致, 因此易出现假阳性结果。

若在常规的阴性对照中加入一定量的组氨酸, 这些组氨酸对应于不同浓度的中药中所含的组氨酸量, 则经修订后 Ames 检测的阴性对照就包含第一种和第二种来源的回复子, 就可以排除因中药中组氨酸成分造成的假阳性结果, 提高 Ames 检测结果与致畸致癌检测结果的符合度。

4.2 将常规 Ames 检测用的组氨酸限量的培养基改为组氨酸过量的培养基: 不同样品不同浓度引入测试体系的少量组氨酸对最终的实验结果的影响微乎其微, 而被忽略不计。如此, Ames 检测体系中的超量组氨酸将掩盖样品中少量组氨酸对最终结果的影响。

4.3 以回复突变频率为检测指标: 利用 Ames 检测的菌株, 以回复突变频率取代回复子绝对数量作为检测指标, 可以避免样品中组氨酸对最终结果的影响。回复突变频率为回复子细胞数与存活细胞总数的比值。样品中存在组氨酸, 不仅回复子细胞的数目增加, 细胞总数同时也增加, 因此若样品无致突变性则回复突变频率不会改变。

5 结语

国内外现有的 Ames 检测体系的修订方法都不适合中药致突变性检验, 我国现行的国家标准会导致假阳性出现。目前在各个具有国家认证的检验资质的遗传毒理实验室中, 对某些食品、化妆品、保健品等, 对于可能因含有组氨酸成分而导致假阳性结果的样品, 其致突变性检验往往只采用小鼠实验或红细胞实验而避开 Ames 检测。因为体外致突变性检验所具有的无法替代的简便性, 说明建立适合中药体外致突变性检验的 Ames 检测体系, 并对现有的国家标准进行修订, 具有重要意义和迫切性。

参考文献:

[1] Ames B N, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test [J]. *Mutat Res*, 1975, 31: 347-364

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

[3] Mortelmans K, Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay [J]. *Mutat Res*, 2000, 455: 29-60

[4] 中华人民共和国食品安全性毒理学评价程序和方法 [S]. GB 15193-94, 2003

[5] Aeschbacher H, Finot P A, Wolleb U. Interactions of histidine-containing test substances and extraction methods with the Ames mutagenicity test [J]. *Mutat Res*, 1983, 113: 103-116

[6] Bruch D B, Bryan G T. Presence and measurement of sample histidine in the Ames test: quantification and possible elimination of a source of false positive mutagenicity test results [J]. *Environ Mol Mutagen*, 1987, 10: 397-410

[7] Gibson J F, Baxter P J, Hedworth-Whitty R B, et al. Urinary mutagenicity assays: a problem arising from the presence of histidine associated growth factors in XAD-2 prepared urine concentrates, with particular relevance to assays carried out using the bacterial fluctuation test [J]. *Carcinogenesis*, 1983, 4: 1471-1476

[8] 刘波, 金建玲, 张辉, 等. Ames 测试不确定性分析 [J]. *应用与环境生物学报*, 2007, 13(5): 726-730.

[9] Cornor T H, Ward J B, Legator M S. Absence of mutagenicity in the urine of autopsy service workers exposed to formaldehyde: factors influencing mutagenicity testing of urine [J]. *Arch Occup Environ Health*, 1985, 56: 225-237.

- [10] Gräter A, Friederich U, Wurgler F E. The mutagenicity of edible mushrooms in a histidine-independent bacterial test system [J]. *Food Chem Toxicol*, 1991, 29: 159-165.
- [11] Nylund L, Einistö P. Mutagenicity testing of protein-containing and biological samples using the Ames/*Salmonella* plate incorporation test and the fluctuation test [J]. *Mutat Res*, 1993, 272: 205-214.
- [12] Verhagen H, Buijntjes-Roizer G C, Coenen T M, et al. Modified suspension Ames test for testing proteinaceous substances: an initial step [J]. *Food Chem Toxicol*, 1994, 32: 1161-1166.
- [13] Prival M J, Simmon V F, Mortelmans K E. Bacterial mutagenicity testing of 49 food ingredients gives very few positive results [J]. *Mutat Res*, 1991, 260: 321-329.
- [14] Czyz A, Jasiecki J, Bogdan A, et al. Genetically modified *Vibrio harveyi* strains as potential bioindicators of mutagenic pollution of marine environments [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 599-605.
- [15] Podgórska B, Chęć E, Ulanowska K, et al. Optimisation of the microbiological mutagenicity assay based on genetically modified *Vibrio harveyi* strains [J]. *J Appl Genet*, 2005, 46: 241-246.
- [16] Aufderheide M, Gressmann H. A modified Ames assay reveals the mutagenicity of native cigarette mainstream smoke and its gas vapor phase [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2007, 58: 383-392.
- [17] Flückiger-Isler S, Baumeister M, Braun K, et al. Assessment of the performance of the Ames IITM assay: a collaborative study with 19 coded compounds [J]. *Mutat Res*, 2004, 558: 181-197.
- [18] 陆华, 马康目, 孙皎, 等. Ames 试验与 MLA 试验检测两味含马兜铃酸中药的致突变性 [J]. 癌变·畸变·突变, 2007, 19(6): 484-486.
- [19] 郭晓昕, 程鲁榕. 马兜铃酸毒理学性研究与启示 [J]. 中国新药杂志, 2005, 14(3): 363-366.
- [20] 谢大英, 王雅文. 马兜铃酸 A 的致突变性 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1987, 2(2): 208.
- [21] 张卫明, 顾龚平, 史劲松. 银杏叶食用安全性的毒理学评价 [J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2005, 28(1): 80-83.
- [22] 陈世伟, 张杰. 银杏叶提取物致突变研究 [J]. 河南预防医学杂志, 1999, 10(3): 151-152.
- [23] 吴金龙, 王丽云, 宋凌洁, 等. 银杏叶提取物致突变性研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 1996, 8(4): 217-219.
- [24] 张建清, 苏诚玉, 权玉玲, 等. 四种补益中药的急性毒性和致突变性研究 [J]. 现代预防医学, 1999, 26(1): 26-28.
- [25] 孔祥环, 蒋保季, 王惠琴, 等. 发酵培育冬虫夏草毒理研究 ② 致突变性研究 [J]. 首都医科大学学报, 1995, 16(4): 256-258.
- [26] 金少华, 姚根和, 赵恒奎, 等. 人工虫草菌丝体毒性与致突变性研究 [J]. 安徽预防医学杂志, 1997, 3(3): 8-10.
- [27] 马继霞, 王世英, 李玲君. 冬虫夏草人工菌丝诱变及抗诱变效应研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 1995, 7(2): 85-87.
- [28] 肖志勇, 李晔, 陈先娟, 等. 灵芝孢子油急性毒性及致突变性研究 [J]. 中南药学, 2006, 4(4): 264-267.
- [29] 陈新霞, 石根勇, 吴金龙, 等. 浓缩灵芝胶囊急性毒性及致突变性研究 [J]. 江苏预防医学, 1996, 7(3): 16-18.
- [30] 郑智敏, 董伟华, 刘桂亭, 等. 红花提取物的诱变性研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 1991, 3(2): 74-75.
- [31] 张春颖, 周钟鸣. 常见中药的致突变性研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2001, 8(3): 20-22.
- [32] 王瑞, 胡边, 殷学军. 中药遗传毒理学研究进展 [J]. 中成药, 2002, 24(1): 57-59.
- [33] 刘明哲, 赵革平, 黄品钱, 等. 41 种中药的诱变和抗诱变作用的研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 1992, 4(3): 25-29.
- [34] 赵泽贞, 温登瑰, 魏丽珍, 等. 11 种天然药材及植物的抗突变与致突变同步试验报告 [J]. 癌变·畸变·突变, 1994, 6(2): 28-30.
- [35] 龚太平, 宋世震, 肖文荟, 等. 传统中医抗衰老中药遗传毒性的体外实验研究 [J]. 河北中医, 1998, 20(4): 256-257.
- [36] 殷学军, 刘德祥, 王河川, 等. 102 种中药水溶性提取物的诱变性筛选 [J]. 癌变·畸变·突变, 1989, 1(1): 27-33.
- [37] Yin X J, Liu D X, Wang H C, et al. A study on the mutagenicity of 102 raw pharmaceuticals used in Chinese traditional medicine [J]. *Mutat Res*, 1991, 260: 73-75.
- [38] 周晓园, 陶凯, 高晓奇, 等. 中药石菖蒲、九节菖蒲致畸、致突变的研究 [J]. 中草药, 1998, 29(2): 110-112.
- [39] 苗明三, 杨桂芳. 中药的三致作用 [J]. 河南中医药学刊, 2002, 17(1): 1-3.
- [40] 渡到富士雄. 生药热汤抽出物的突然变异原性 [J]. 生药学杂志, 1983, 37: 237-240.

冬虫夏草化学成分研究进展

王 征, 刘建利*

(西北大学生命科学院 西部资源生物与现代生物技术省部共建教育部重点实验室, 陕西 西安 710069)

摘 要: 冬虫夏草是我国的名贵中药材, 是冬虫夏草菌寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫的子座及幼虫尸体的复合体。含有氨基酸、核苷、多糖、甾醇及甘露醇等多种活性成分, 另外还含有脂肪酸、挥发油以及无机元素等多种成分。对近年来国内外关于冬虫夏草化学成分的研究进行综述。

关键词: 冬虫夏草; 冬虫夏草菌; 活性成分

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)07-1157-04

Advances in studies on chemical constituents of *Cordyceps*

WANG Zheng, LIU Jian-li

(Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, School of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Key words: *Cordyceps*; *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.; active constituent

* 收稿日期: 2008-12-12

基金项目: 国家自然科学基金(30070905, 20872118); 陕西省重点实验室基金资助(08JZ74)

作者简介: 王 征(1986—), 男, 陕西咸阳人, 硕士, 现从事天然产物的仿生合成及结构修饰研究。

Tel: (029) 88302013 E-mail: wazh0405@126.com