

牡丹籽油软胶囊回复突变试验的研究

张爽, 童琳, 许勇, 李舜, 叶红* (安徽省医学科学研究院, 安徽合肥 230061)

摘要 [目的]采用鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶试验(Ames)对牡丹籽油软胶囊进行安全性毒理学试验。[方法]试验选用鼠伤寒沙门氏菌 TA97、TA98、TA100 和 TA102 菌株,将牡丹籽油软胶囊配制成浓度为 5.0、1.0、0.2、0.04 mg/皿 4 个剂量,和阳性对照组(叠氮钠、2-氨基苄、敌克松)进行比较,观察各菌株的回变菌落数。[结果]牡丹籽油对 4 个菌株诱发的回变菌落数均未超过对照组 2 倍,为阴性结果。[结论]牡丹籽油对鼠伤寒沙门氏菌无直接致突变作用。

关键词 鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶试验;致突变性;诱变;牡丹籽油

中图分类号 TS225.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)33-0079-02

Study on Reversion Mutation Test of Peony Seed Oil Soft Capsule

ZHANG Shuang, TONG Lin, XU Yong, YE Hong* et al (Anhui Academy of Medical Sciences, Hefei, Anhui 230061)

Abstract [Objective] To study the safe toxicology of Peony Seed Oil Soft Capsule by Salmonella typhimurium/Mammalian Microsomal Enzyme Test (Ames). [Method] To use Peony Seed Oil and adopt Ames test, Salmonella typhimurium TA97, TA98, TA100 and TA102 strains were selected. Sodium azide, 2-aminofluorene, dextan was chosen as a mutagen, respectively add 5.0, 1.0, 0.2, 0.04 mg/dish extract, and statistically revertant colonies. [Result] The number of revertant colonies was no more than twice of that of spontaneous colonies for each dosage group and there was no dose-response relationship existed. [Conclusion] Peony seed oil had no mutagenicity in this test.

Key words Salmonella typhimurium/Mammalian microsomal enzyme test; Mutagenicity; Mutation; Peony seed oil

牡丹籽油是牡丹籽中提取的植物油,是我国特有的木本坚果油。牡丹籽油具有很高的总营养价值,成分结构合理,含有丰富的多不饱和脂肪酸,亚麻酸含量是橄榄油的 200 多倍,又不易氧化沉积在人体血管壁、心脏冠状动脉等部位,是非常理想的食用油^[1]。笔者采用鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶试验(Ames)对牡丹籽油软胶囊的致突变性进行了评价,并同时对其抗突变作用及机理加以研究,为牡丹籽油保健食品的开发应用提供了一定的科学参考^[2]。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样品。牡丹籽油软胶囊,褐色软胶囊,规格:0.5 g/粒,60 粒/瓶,批号 20160310,常温密闭干燥处保存。

1.1.2 主要试剂。诱变剂:二甲基亚砷,美国 aladdin 工业公司,批号 L1503022;叠氮钠,上海化学试剂有限公司,批号 Z4183;2-氨基苄,美国 sigma 公司,批号 STBF2332V;敌克松,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司,批号 40709。

大鼠肝液 10% S9Mix,美国 MOLTOX 公司,批号 3601。

1.2 方 法

1.2.1 菌株制备。由安徽省医学科学研究院购买并鉴定合格的鼠伤寒沙门氏菌突变型菌株药片(TA97、TA98、TA100、TA102,美国 MOLTOX 公司),取营养肉汤培养基 5 mL,将菌株药片直接接种于营养肉汤培养基内,于 37 °C 振荡(100 次/min),菌液浓度不少于 $1 \times 10^9 \sim 2 \times 10^9$ CFU/mL。代谢活化系统采用美国 MOLTOX 公司的大鼠肝液 10% S9 Mix 作为体外活化系统(间接致癌物测定其活性符合试验要求)。按照《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)第一部分毒理学评价检验、鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体

酶(AMES)试验方法。

1.2.2 试验步骤。在顶层培养基平板掺入法:在顶层培养基(45 °C 保温)中依次加入增菌好的菌液 0.1 mL,混匀;加样品溶液 0.1 mL(需活化时加入 10% S9 混合液 0.5 mL),再混匀,迅速倒入底层培养基上,转动平皿均匀分布,平放固化,37 °C 培养 48 h 观察结果。Ames 试验中,受试物根据毒性测定结果,设 5.0、1.0、0.2、0.04 mg/皿 4 个剂量组,同时设置对照组,包括阳性对照组(叠氮钠、2-氨基苄、敌克松),溶剂对照组(二甲基亚砷、蒸馏水),未处理对照组(试验时只在培养基上加菌液,不加其他任何试剂),所有对照组均包括加 S9 和不加 S9 2 种情况。每剂量、每种系统均做 3 个平皿。37 °C 培养 48 h 后,计数每皿回变菌落数。整套试验在相同条件下重复 1 次。

1.2.3 结果判定。以直接计数培养基上长出回变菌落数的多少而定,如在背景生长良好条件下,受试物组回变菌落数增加 1 倍以上(即回变菌落数等于或大于 2 乘以未处理对照数),并有剂量反应关系或至少某一测试点有可重复的并有统计学意义的阳性反应,即可认为该受试物诱变试验阳性。

2 结果与分析

Ames 试验检测牡丹籽油软胶囊致突变性结果,牡丹籽油各剂量组对鼠伤寒沙门氏菌 TA97、TA98、TA100 和 TA102 诱发的回变菌落数见表 1 和表 2。结果显示,在加和不加 S9 条件下,牡丹籽油对 4 个菌株诱发的回变菌落数均未超过未处理对照组 1 倍以上,为阴性结果,表明牡丹籽油对鼠伤寒沙门氏菌无直接和间接致突变作用。

Ames 试验是用来检测致突变化学物的一种灵敏、快速方法。其原理主要为人工诱变鼠伤寒沙门氏菌菌株,形成组氨酸营养缺陷型突变菌株^[3]。这种菌株不能合成组氨酸,因而在无组氨酸的培养基上不能生长。在诱变剂的作用下,突变型沙门氏菌会回复为野生型,自行合成组氨酸,形成菌落^[4]。表 1 和表 2 结果说明,在加和不加 S9 的系统下,阳性

基金项目 国家自然科学基金项目(31372417)。

作者简介 张爽(1988—),女,安徽合肥人,助理研究员,硕士,从事预防医学研究。*通讯作者,副研究员,从事预防医学研究。

收稿日期 2017-09-19

表1 牡丹籽油软胶囊 Ames 试验第1次试验结果($\bar{x} \pm s$)Table 1 Results of the first test of Ames test of peony seed oil soft capsule($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	项目 Item	TA97		TA98		TA100		TA102	
		不加 S9	加 S9	不加 S9	加 S9	不加 S9	加 S9	不加 S9	加 S9
		Non-adding S9	Adding S9	Non-adding S9	Adding S9	Non-adding S9	Adding S9	Non-adding S9	Adding S9
样品溶液组 Sample solution group	5.0 mg/皿	90 ± 15.5	97 ± 13.0	26 ± 4.0	23 ± 4.0	120 ± 12.7	118 ± 7.6	344 ± 7.6	347 ± 71.8
	1.0 mg/皿	78 ± 1	84 ± 4.9	26 ± 6.8	24 ± 6.4	129 ± 2.9	101 ± 11.9	314 ± 72.2	351 ± 66.1
	2.0 mg/皿	87 ± 13.1	84 ± 5.0	25 ± 6.0	29 ± 7.6	99 ± 1.5	136 ± 4.0	290 ± 24.1	345 ± 40.0
	0.4 mg/皿	90 ± 11.4	89 ± 12.0	26 ± 1.5	25 ± 3.5	118 ± 1.5	107 ± 15.0	338 ± 43.6	355 ± 33.0
未处理对照组 Untreated control group	—	97 ± 9.0	91 ± 16.5	31 ± 3.5	26 ± 7.0	132 ± 9.6	135 ± 17.8	384 ± 56.1	355 ± 68.5
溶剂对照组 Solvent control group	蒸馏水	103 ± 3.6	95 ± 8.2	27 ± 4.2	25 ± 3.51	131 ± 13.0	126 ± 22.3	339 ± 17.6	367 ± 49.8
	二甲基亚砷	99 ± 13.3	95 ± 5.7	27 ± 7.8	24 ± 4.2	112 ± 12.8	104 ± 6.6	386 ± 33.4	330 ± 37.5
阳性对照组 Positive control group	敌克松	1 373 ± 88.1	—	1 053 ± 80.1	—	—	—	1 395 ± 311.5	—
	叠氮钠	—	—	—	—	1 296 ± 146.6	—	—	—
	2-氨基苄	—	1 101 ± 137.2	—	709 ± 60.0	—	952 ± 128.7	—	—

表2 牡丹籽油软胶囊 Ames 试验第2次试验结果($\bar{x} \pm s$)Table 2 Results of the second test of Ames test of peony seed oil soft capsule($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	项目 Item	TA97		TA98		TA100		TA102	
		不加 S9	加 S9	不加 S9	加 S9	不加 S9	加 S9	不加 S9	加 S9
		Non-adding S9	Adding S9	Non-adding S9	Adding S9	Non-adding S9	Adding S9	Non-adding S9	Adding S9
样品溶液组 Sample solution group	50.0 mg/皿	84 ± 12.2	95 ± 9.0	26 ± 5.0	25 ± 1.5	101 ± 11.9	120 ± 12.7	333 ± 33.0	362 ± 26.6
	10.0 mg/皿	88 ± 15.5	78 ± 1.53	24 ± 7.6	26 ± 2.7	107 ± 21.0	106 ± 11.5	330 ± 22.1	354 ± 39.1
	2.0 mg/皿	82 ± 6.2	87 ± 6.6	27 ± 3.0	25 ± 6.0	122 ± 8.0	112 ± 11.7	330 ± 21.6	351 ± 11.4
	0.4 mg/皿	84 ± 10.5	83 ± 9.5	22 ± 5.0	27 ± 2.1	122 ± 9.1	127 ± 5.1	361 ± 34.3	331 ± 22.3
未处理对照组 Untreated control group	—	102 ± 9.5	94 ± 11.0	26 ± 3.2	24 ± 2.9	140 ± 7.5	136 ± 7.0	364 ± 12.7	335 ± 43.9
溶剂对照组 Solvent control group	蒸馏水	99 ± 2.7	94 ± 16.8	32 ± 4.5	25 ± 5.6	128 ± 2.7	123 ± 7.0	377 ± 12.0	358 ± 40.0
	二甲基亚砷	91 ± 5.9	93 ± 13.8	28 ± 2.5	25 ± 6.0	118 ± 18.4	103 ± 8.7	317 ± 17.8	317 ± 42.7
阳性对照 Positive control group	敌克松	1 352 ± 209.8	—	1 101 ± 216.1	—	—	—	1 237 ± 253.0	—
	叠氮钠	—	—	—	—	1 480 ± 136.7	—	—	—
	2-氨基苄	—	888 ± 112.9	—	565 ± 116.0	—	920 ± 102.1	—	—

诱变剂的菌落回变数明显增加,试验重复性好,系统可信。

3 讨论

菌株制备对于试验非常重要。菌株制备该试验采用了过夜振动摇晃与静置培养2种方法。过夜振动摇晃13~15 h后,菌株的浓度可以达到试验需要浓度 $1 \times 10^9 \sim 2 \times 10^9$ CFU/mL,而静置培养15 h的菌株浓度达不到试验要求,所以在试验中需要采用振动摇晃的方式进行菌株制备。在平板掺入法试验中,TA97菌株对于葡萄糖的浓度比较敏感。根据购买菌株的MOLTOX公司的指导意见,在标准培养基配方中,TA97的生长往往会受到葡萄糖水平的抑制(2%的葡萄糖),在0.4%葡萄糖的标准培养基上生长得更好。所以在配置底层培养基平皿时,分别制备了2.0%和0.4%2个葡萄糖浓度的平皿,但是试验结果发现没有出现显著差异。

牡丹籽油作为新兴的油类保健食品,对于其的质量控制

非常关键^[5]。TA97、TA98、TA100可用于检测移码突变,TA102可用于检测碱基对置换,由于TA系的菌株回复突变的特异性高,所以有些致突变物可能难以检出。通过对Ames试验的改进,或寻求一种更加简便的方法用来检测牡丹籽油保健食品的安全性是今后的研究目标^[6]。

参考文献

- [1] 翟文婷,朱献标,李艳丽,等.牡丹籽油成分分析及其抗氧化活性研究[J].烟台大学学报(自然科学与工程版),2013,26(2):147-150.
- [2] 王心如.毒理学基础[M].北京:人民卫生出版社,2003.
- [3] 钱星文,刘凡,彭菊,等.当归双参蛤蟆油片的遗传毒性实验研究[J].光明中医,2015(3):499-500.
- [4] 石爱华,李卫东,翟鹏贵,等.西洋参提取物的毒理学试验研究[J].中华中医药学刊,2014(8):2002-2004.
- [5] 王伟伟.牡丹籽油中脂肪酸的构成及生理功能[J].中国卫生产业,2011(36):8-9.
- [6] 张伟清,曹进,丁宏,等.对保健食品理化质量标准建立的思考[J].中国药师,2016,19(7):1352-1354.
- [38] 陈业高.植物化学成分[M].北京:化学工业出版社,2004:223,245,158.
- [39] 渡边和浩.抗病毒药用组合物:平1-175942[P].1989-07-12.
- [40] VIJAYA K,ANANTHAN S,NALINI R. Antibacterial effect of theaflavin, polyphenon 60(*Camellia sinensis*) and *Euphorbia hirta* on *Shigella* spp.: A cell culture study[J]. Journal of ethnopharmacology,1995,49(2):115-118.
- [41] TSUCHIYA H,SATO M,MIYAZAKI T,et al. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of ethnopharmacology,1996,50(1):27-34.
- [42] 徐进,赵声兰,陈朝银,等.细菌抗单宁作用机制及其意义[J].生物学杂志,2008,25(4):4-6.
- [43] KNOBLOCH K,PAULI P,IBERL B,et al. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components [J]. Journal essential oil research,1989,1(3):119-128.
- [44] 李杨,左国营.生物碱类化合物抗菌活性研究进展[J].中草药,2010,41(6):1006-1014.
- [45] PARK K D,LEE J H,KIM S H,et al. Synthesis of 13-(substituted benzyl)berberine and berberrubine derivatives as antifungal agents [J]. Bioorganic and medicinal chemistry letters,2006,16(15):3913-3916.
- [46] 王琼,何清君.植物抗菌肽研究进展[J].四川师范学院学报(自然科学版),2000,21(2):141-145.
- [47] TAN L T,THOMAS W R,GERWICK W H,et al. Cis,cis-and trans-ceratospongamide,new bioactive cyclic heptapeptides from the Indonesian red alga *Ceratodictyon spongiosum* and symbiotic sponge *Sigmadocia symbiotica*[J]. Journal of organic chemistry,2000,65(2):419-425.

(上接第78页)