

人工蛹虫草子实体不同提取物的致突变作用

李志, 黄俊明, 杨颖, 陈秀娟, 蔡玟, 胡永成, 黄志彪

摘要: [目的] 研究人工蛹虫草子实体水提物和醇提物的致突变可能性。 [方法] 以经口灌胃方式, 分别给予小鼠不同剂量的人工蛹虫草子实体水提物和醇提物, 观察其对小鼠骨髓细胞微核率和小鼠精子畸形率的影响; 以不同剂量的人工蛹虫草子实体水提物和醇提物稀释液对体外哺乳动物细胞(CHL)进行处理, 观察其对 CHL 染色体畸变率的影响。 [结果] 2.5、5.0、10.0 g/kg 组小鼠的骨髓细胞微核率和精子畸形率与阴性对照组比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$); 在加和不加代谢活化系统条件下, 156.0、321.0、625.0、1 250.0、2 500.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组的 CHL 染色体畸变率与阴性对照组比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。 [结论] 在本研究条件下未发现两种人工蛹虫草子实体提取物具有直接或间接的致突变作用。

关键词: 蛹虫草; 子实体; 致突变; 染色体

A Study on Mutagenesis of Artificial Cordyceps Militaris Fruitbody Extracts LI Zhi, HUANG Jun-ming, YANG Ying, CHEN Xiu-juan, CAI Wen, HU Yong-cheng, HUANG Zhi-biao(Department of Toxicology, Center for Disease Control and Prevention of Guangdong Province, Guangzhou, Guangdong 510300, China)

Abstract: [Objective] To study possible mutagenic and genetic toxicity of the Artificial Cordyceps Militaris Fruitbody Water Extract(ACMFWE)and the Artificial Cordyceps Militaris Fruitbody Ethanol Extract(ACMFEE)on mice. [Methods] Total of 120 mice were orally administered with ACMFWE and ACMFEE in various concentrations, micronucleus in bone marrow cells and sperm abnormalities of mice were observed; different concentrations of ACMFWE and ACMFEE were applied to *in vitro* mammalian cells(CHL), and the chromosome aberration was observed. [Results] The bone marrow cells micronucleus rates and sperm deformity rates of mice showed no difference compared to the corresponding control groups when treated with 2.5-10.0 g/kg ACMFWE or ACMFEE. With or without the metabolic activation system, the chromosome aberration rates of CHL were also found no significant difference compared to the corresponding control groups when treated with 156.0-2500.0 $\mu\text{g/mL}$ ACMFWE or ACMFEE. [Conclusion] No direct or indirect mutagenesis or genetic toxicity was found in mice treated with two kinds of artificial Cordyceps fruiting body extract in current study.

Key Words: *Cordyceps militaris*; fruitbody; mutagenic; chromosome

人工蛹虫草子(*Cordyceps militaris*)实体是从天然野生的蛹虫草中分离得到的菌种拟青霉(*Paecilomyces militaris*)经人工培养所获得的子实体, 其与天然冬虫夏草同为虫草属真菌^[1]。近年来, 人们对人工蛹虫草子实体功效作用有了广泛关注, 以其水提物和醇提物为主要成份的各种产品也不断推向市场。同时人工蛹虫草子实体水提物和醇提物以一种新的食用和药用资源的形式出现, 其食用安全性也越来越受到社会的广泛重视。人工蛹虫草子实体水提物和醇提物是采用不同溶剂作为载体对人工蛹虫草子实体的主要成份进行提取, 目前有关两种提取物致突变作用方面的研究少见报道。为了探讨两种提取物是否具有致突变的可能性, 及了解两者在致突变作用方面可能存在的不同效果, 本研究拟采用微核试验、精子畸形试验和体外哺乳动物细胞染色体畸变试验对人工蛹虫草子实体水提物和醇提物的致突变作用进行研究。

[基金项目] 广东省中医药局科研基金资助(编号: 2007189)

[作者简介] 李志(1975-), 男, 本科, 副主任医师; 研究方向: 遗传毒理学; E-mail: LZGDCDC@yahoo.com.cn

[作者单位] 广东省疾病预防控制中心毒理实验室, 广东 广州 510300

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 实验动物和实验室 广东省医学实验动物中心提供的 SPF 级 NIH 种健康小鼠 120 只, 动物生产许可证号: SCXK(粤) 2008-0002; 合格证编号: 0046274。小鼠饲养于 SPF 级动物实验室[使用许可证号: SYXK(粤) 2008-0011], 给予无菌饲料和水, 并保持 12h 照明。

1.1.2 主要试剂 人工蛹虫草子实体水提物、人工蛹虫草子实体醇提物(购自某公司); 环磷酰胺(Cyclophosphamide, CP)、秋水仙素(Colchicine, COL)、丝裂霉素 C(Mitomycin, MMC), 均购于美国 Sigma 公司。

1.1.3 细胞和培养条件 中国地鼠肺细胞株(Chinese Hamster lung cell line, CHL), 引自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所。细胞采用 MEM 培养基加入青、链霉素(100 units/mL) 和 10% 胎牛血清的培养液在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱内培养。

1.2 方法

1.2.1 微核试验 (1) 剂量与分组: 经检测人工蛹虫草子实体水提物和醇提物的半数致死量(LD₅₀) 均大于 15.00 g/kg, 故

将两种提取物的最高剂量都设为 10.00 g/kg, 其下分别设中剂量组(5.00 g/kg)和低剂量组(2.50 g/kg), 并同时设阴性对照组(纯净水)和阳性对照组(CP, 0.05 g/kg)。选择小鼠 80 只, 体重 25~30 g, 按体重随机分为 8 组, 每组 10 只, 雌雄各半。(2)方法: 采用经口灌胃方式给药, 每次灌胃量为 0.2 mL/kg。第一次给药后 24 h 后以相同剂量进行第二次给药, 第二次给药 6 h 后, 脱颈处死小鼠取胸骨骨髓材料制片、染色、油镜下每只小鼠观察 1000 个嗜多染红细胞(PCE), 计数含有微核的 PCE 数, 计算各组微核发生率(%)。

1.2.2 精子畸形试验 (1)剂量与分组: 给药剂量及分组均同“1.2.1”, 即设高剂量组(10.00 g/kg)、中剂量组(5.00 g/kg)和低剂量组(2.50 g/kg), 并同时设阴性对照组(纯净水)和 CP 组(0.05 g/kg)。选择雄性小鼠 40 只, 体重 25~30 g, 按体重随机分为 8 组, 每组 5 只。(2)方法: 采用经口灌胃方式给药, 每次灌胃量为 0.2 mL/kg, 每天灌胃一次, 连续灌胃 5 d。首次给药后第 35 天处死动物取双侧副辜按常规制片、染色, 高倍镜下每只小鼠观察 1000 条完整精子, 计数含有精子畸形的数量和类型, 计算各组精子畸形发生率(%)。

1.2.3 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验 (1)剂量与分组: 因许多致癌物质在哺乳类动物体内受代谢活化而显示其作用, 故本试验在加和不加代谢活化系统两种条件下进行。经预试验发现, 在加和不加代谢活化系统条件下, 人工蛹虫草子实体水提物和醇提物于 5 000 μg/mL 浓度对 CHL 有较大的细胞毒性(细胞覆盖程度 < 50%), 故水提物组和醇提物组均选择 2 500.0 μg/mL 为最高浓度剂量。水提物组和醇提物组分别设 2 500.0、1 250.0、625.0、312.0 和 156.0 μg/mL 5 个浓度剂量, 并同时设 1 个阴性对照组(溶剂)和 2 个阳性对照组(CP, 120.0 μg/mL; MMC, 1.6 μg/mL)。(2)方法: 将 CHL 接种于 6 孔培养板中, 接种密度为 1×10^6 个/孔, 37℃、5% CO₂ 培养 24 h 后, 吸去培养皿中的培养液, 加入不同浓度的受试物及不含血清的培养液。阴性对照组(非代谢活化)仅加培养液, 阴性对照组(代谢活化)同时加入 S9 混合物; 阳性对照组(代谢活化)加入 CP, 阳性对照组(非代谢活化)加入 MMC。将 6 孔培养板放入培养箱中培养作用 2 h 后, 弃去培养液, 用 D-Hanks 液洗细胞 3 次, 加入含 10% 新生小牛血清的培养液, 继续培养 24 h 后收获细胞, 在收获细胞前 4 h 加入 COL, 终浓度为 1.0 μg/mL。按常规方法消化、低渗、固定、制片、Giemsa 染色。对各受试物组、阴性对照组及阳性对照组各选取 100 个良好的中期分裂相细胞, 进行染色体畸变分析, 记录染色体结构畸变的类型和数目, 并计算染色体畸变率。

1.3 统计分析

实验数据采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析。微核试验数据采用泊松分布方法^[2], 精子畸形试验数据采用 Wilcoxon 秩和检验方法^[2]。细胞染色体畸变试验数据采用 χ^2 分析方法^[3]。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 微核试验结果

由表 1 可见, 各剂量组处理的小鼠骨髓细胞微核形成率,

与阴性对照组比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 人工蛹虫草子实体水提物和醇提物对小鼠骨髓细胞微核率的影响(%)

组别 (g/kg)	水提物		醇提物	
	雌	雄	雌	雄
高剂量组(10.00)	1.6 ± 0.9	1.2 ± 0.8	2.2 ± 0.8	1.8 ± 0.8
中剂量组(5.00)	2.0 ± 1.0	1.8 ± 1.1	1.4 ± 0.5	2.4 ± 1.0
低剂量组(2.50)	1.8 ± 0.8	2.0 ± 1.2	1.6 ± 0.9	1.8 ± 0.8
阴性对照组(0.00)	1.6 ± 0.5	1.4 ± 0.5	1.6 ± 0.5	1.4 ± 0.5
阳性对照组(CP)	25.8 ± 5.0	26.8 ± 4.8	25.8 ± 5.0	26.8 ± 4.8

2.2 精子畸形检测结果

由表 2 可见, 各剂量组处理的小鼠精子畸形率, 与阴性对照组比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 人工蛹虫草子实体水提物和醇提物对小鼠精子畸形率(%)的影响

组别 (g/kg)	水提物		醇提物	
	精子畸形数 (条)	精子畸形率 (%)	精子畸形数 (条)	精子畸形率 (%)
高剂量组(10.00)	77	15.4 ± 1.9	78	15.6 ± 1.5
中剂量组(5.00)	78	15.6 ± 2.3	75	15.0 ± 0.7
低剂量组(2.50)	72	14.4 ± 1.7	74	14.8 ± 0.8
阴性对照组(0.00)	66	13.2 ± 0.8	66	13.2 ± 0.8
阳性对照组(CP)	280	56.0 ± 9.8	280	56.0 ± 9.8

2.3 染色体畸变检测结果

由表 3 可见, 各剂量组处理的 CHL 染色体畸变率, 与阴性对照组比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 人工蛹虫草子实体水提物和醇提物对 CHL 染色体畸变率(%)的影响

组别	终浓度 (μg/mL)	观察细胞数 (个)	水提物		醇提物	
			+ S ₉	- S ₉	+ S ₉	- S ₉
阴性对照	0.0	100	2	3	2	3
	2500.0	100	3	4	4	3
受试物	1250.0	100	3	3	3	3
	625.0	100	3	3	4	4
	312.0	100	2	4	3	4
	156.0	100	3	2	3	3
环磷酰胺(CP)	120.0	100	37	—	37	—
丝裂霉素 C(MMC)	1.6	100	—	26	—	26

3 讨论

人工蛹虫草子实体水提物和醇提物是采用不同溶剂作为载体对人工蛹虫草子实体的主要成份进行提取, 其中水提物含有的多为溶于水的无机成份, 而醇提物含有的多为有机成份, 目前市场上销售的产品基本上以这两种提取物为主要成份。为综合探讨人工蛹虫草子实体两种提取物是否具有致突变的可能性, 及了解两者在致突变作用方面可能存在的不同效果, 本研究对两种提取物同时进行检测。结果显示, 在本研究条件下, 未发现人工蛹虫草子实体水提物和醇提物有诱导小鼠的骨

髓细胞微核形成的作用,未发现两种提取物对体细胞有致突变作用;未发现人工蛹虫草子实体水提取物和醇提取物有诱导小鼠精子畸形的作用,未发现两种提取物对体内生殖细胞有致突变作用。

遗传毒性试验主要用于致癌性预测。有些化学物质本身无毒或毒性较低,但当其在体内经过生物转化后,形成的代谢产物毒性比母体物质增大,甚至产生致癌、致突变、致畸作用,这一过程称为代谢活化。因许多致癌物质在哺乳类动物体内受代谢活化而显示其作用,所以在进行体外试验加有辅酶的 S_0 混合物作为致癌物质的代谢活化系统是非常必要的^[4-6]。本研究中CHL染色体畸变试验是在加和不加代谢活化系统两种条件下进行,这样可更加全面地反映受试物的致突变作用情况,结果显示在本研究条件下未发现人工蛹虫草子实体水提取物和醇提取物有增加体外哺乳动物细胞染色体畸变的作用,未发现两种提取物具有致突变性。

李欣等^[7]的研究发现蛹虫草子实体水提取物对小鼠 γ 射线辐照引起的体液免疫损伤和遗传物质染色体的损伤都有较好的保护作用。而本研究也未发现人工蛹虫草子实体水提取物和醇提取物有致突变作用,两种提取物在致突变性方面也未发现有明显不同。

参考文献:

- [1] 王瑞华,杨昕,杨仁锐,等.人工蛹虫草子实体中游离麦角甾醇的提取及含量测定[J].中国药师,2008,11(4):412-414.
- [2] 卢静,关爽,姜玮,等.低纯度熊果酸对小鼠致变性及其拮抗作用的研究[J].毒理学杂志,2010,24(1):37-40.
- [3] 环飞,程洁,靳苏香,等.槲皮素对中国地鼠肺成纤维细胞、小鼠骨髓细胞和小鼠睾丸精母细胞染色体影响的初步研究[J].现代生物医学进展,2010,10(11):2013-2016.
- [4] ARMSTRONG SA, LOOK AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(26):6306-6315.
- [5] VENKATESH P, SHANTALA B, JAGETIA GC. Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by Aegle marmelos in mouse bone marrow: a micronucleus study[J]. Integr Cancer Ther, 2007, 6(1):42-53.
- [6] JAWAD M, GIOTOPOULOS G, FITCH S. Mouse bone marrow and peripheral blood erythroid cell counts are regulated by different autosomal genetic loci[J]. Blood Cells Mol Dis, 2007, 38(2):69-77.
- [7] 李欣,王京滨,莫艳玲,等.蛹虫草子实体水提取物对辐射损伤的保护作用研究[J].华南预防医学,2006,32(3):58-60.

(收稿日期:2010-01-04)

(英文编审:金克峙;编辑:郭薇薇;校对:徐新春)

(上接第694页)

参考文献:

- [1] 裘欣,项海青,施世锋,等.中学生父母烟草依赖性、吸烟影响因素及其对中学生吸烟状况影响分析[J].中国预防医学杂志,2007,8(6):675-677.
- [2] 杨功焕.1996年全国吸烟行为的流行病学调查[M].北京:中国科学技术出版社,1997:17-18.
- [3] 吴谦,庄贵华,王学良.陕西省某高校高年级男生吸烟现状调查[J].中国学校卫生,2007,28(7):650-651.
- [4] 季成叶.2005年中国青少年健康相关/危险行为调查综合报告[M].北京:北京大学医学出版社,2007:165-207.
- [5] 马杰民,杨功焕,王黎君,等.石家庄、遵义两市中学生吸烟行为研究[J].中国慢性病预防与控制,2001,9(6):260-264.
- [6] 中国预防医学科学院,中华人民共和国疾病控制司,中国吸烟与健康协会.1996年全国吸烟行为的流行病学调查[M].北京:中国科学技术出版社,1997:155-158.
- [7] 杨建文.兰州理工大学学生吸烟现状及其原因分析[J].中国学校卫生,2005,26(4):284-285.
- [8] 刘琳,张小梅,宋光,等.综合院校大学生吸烟及认知状况调查[J].中国公共卫生,2007,23(5):616-617.
- [9] 黄杏,陈冬峨,王增珍,等.武汉大学医学院学生吸烟行为及其相关因素分析[J].中国学校卫生,2007,28(8):687-689.
- [10] 许小频,郝瑞丰,聂少萍,等.广州青少年吸烟现状研究[J].中国学校卫生,2001,22(1):13-15.
- [11] 李爱兰,黄悦勤,王燕玲,等.我国青少年学生吸烟行为及其影响因素的初步分析[J].中国公共卫生,2001,17(1):75-77.
- [12] 裘欣,项海青,程彬,等.杭州市大学生吸烟状况及社会心理因素分析[J].中国学校卫生,2005,26(8):622-623.

(收稿日期:2009-12-01)

(英文编审:黄建权;编辑:洪琪;校对:徐新春)

本刊编辑部迁址通知

本刊编辑部从2010年7月22日起,地址变更为:上海市延安西路1326号22楼;邮编:200052;电话:021-61957512,515,518;传真:021-62084529,021-52379628。

《环境与职业医学》编辑部