

## 21 种中草药抗 Trp-P-1 的致突变活性

吴阿富<sup>1</sup> 吴 1 王伟郎<sup>2</sup> 陈宇峰<sup>3</sup> 朱健儿<sup>3</sup> MIKINIIKAWA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>浙江医科大学药学院 杭州 310031 <sup>2</sup>磐安县人民医院 磐安 322300 <sup>3</sup>中科院上海药物所 上海 200032 <sup>4</sup>日本岐阜药科大学 岐阜 502

**摘要** 本文采用 Ames 系统对 21 种中草药 60%乙醇提取试样抗 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1) 致突变活性进行检测。实验结果表明,其中七种中草药:猫人参、黄药子、关木通、山偏柏、半支莲、五加皮、花椒具有较强的抗 Trp-P-1 致突变活性。川牛膝、莪术的乙醇提取物没有抗 Trp-P-1 致突变活性,但是川牛膝、莪术的水提取物有抗 Trp-P-1 的致突变活性。

**关键词** 抗突变性;中草药;Ames 试验

## ANTIMUTAGENIC ACTIVITY ON THE TRP-P-1 OF 21 CHINESE MEDICINAL PLANTS

Wu Afu<sup>1</sup>, Wu Min<sup>1</sup>, Wang Xue lang<sup>2</sup>, Chen Yufeng<sup>3</sup>, Zhu Jianer<sup>3</sup>, MIKINIIKAWA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Zhe jiang Medical University, Hangzhou 310031, <sup>2</sup>Department of Pharmacy, Zhe-jiang Pan an People's Hospital, Panan 322300, <sup>3</sup>Shanghai Institute of Materia Medicine, Shanghai 200032, <sup>4</sup>Department of Public Health, Medicinal Plants Gifu, Pharmaceutical University, Gifu 502, Japan

**Abstract** The antimutagenicity of 21 traditional Chinese herbal medicinal plants on Trp-P-1 were investigated with Ames bioassay system. It was found that *Actinidia valvata* Dunn, *Dioscorea bulbifera* L., *Aristolochia manshuriensis* Kom., *Selaginell adoederleinii* Hieron., *Scutellaria revularis* Wall., *Acanthopanax gracilistylus* W. W. Smith. and *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. possessed strong antimutagenic effects. The an-

污染具有致癌危险性。

### 参考文献

- 1 朱振岗,甘卉芳,郭殿林,等. S 江有机污染的致癌危险性研究. 中国环境科学,1985;5(3):7
- 2 张尤恩,郭殿林,陶可圣,等. 松花江有机污染源筛选及其治理措施效果的环境医学研究. 中国环境科学,1992;12(2):127
- 3 沈建英. 致癌物鉴定方法的现状及展望. 中国公共卫生学报,1996;15(6):355
- 4 黄幸纾,陈星若. 环境化学物致突变致畸变实验方法. 第一版,杭州:浙江科学技术出版社,1985:173
- 5 聂岚,朱惠刚. UDS 试验和细胞转化试验对水质致癌性的研究. 中国环境科学,1993;13(1):39
- 6 Pieter VR, Ronald GW. Isolation of organic water pollutants by SAD resins and carbon. *J Chromator*, 1978;150:381
- 7 魏爱雪,赵国栋,刘晓梯. 地下水有机污染物分析方法. 环境科学丛刊,1986;7(6):80
- 8 郑红俭,王家铃. 大孔树脂吸附水中致突变物的适宜洗脱方式. 环境与健康杂志,1985;2(6):28
- 9 Dunkel VC, Rogers C, Swierenga SHH, et al. Recommended protocol based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories: cell transformation in C3H/10T1/2 mouse embryo cell, BALB/C3T3 mouse fibroblast and Syrian hamster embryo cell cultures. *Mutat Res*, 1991;246:285
- 10 刘国廉,普林. 体外细胞转化系统在预防医学致癌因子检测中的应用. 解放军预防医学杂志,1991;9(2):147
- 11 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术. 第三版. 北京出版社,1995:121
- 12 秦椿华. 化学物致突变、致癌检测技术. 新疆科技卫生出版社(w),1996年8月

(1998-12-12 收稿;1999-04-06 修回)

timutagenic activity on the Trp-P-1 of 60 % EtOH extracts from *Cythula officinalis kuan*. *Curcuma Zedoaria* (Berg). *Rose* had not been found but antimutagenic effects of the aqueous extracts from *Cythula officinalis kuan* and *Curcuma zedoaria*(Berg.) *Rose*. on the Trp-P-1 were observed.

**Key words** Antimutagenicity, Chinese herbal medicines, Ames assay

许多科研工作者已经研究和报告了大量天然生物的抗突变性。Rishii et al(1984)从 300 种植物中发现它们当中 23 种具有抗突变性<sup>(1)</sup>; Tankaniko sato et al. (1984)研究了草—海藻眼子菜属植物的水提取物的抗致突变物质<sup>(2)</sup>; Morita K, et al. (1978)研究了蔬菜和水果中的天然抗突变活性物质<sup>(3)</sup>; Yoshimichi Sakai, et al. (1986)<sup>(4)</sup>、Takako Fujimoto, et al (1987)<sup>(5)</sup>、研究了许多传统中药; Yoshimichi Sakai, et al. (1988, 1990)<sup>(6,7)</sup>等为寻找抗突变物质,研究了 210 个中医处方,用 Ames 试验从 169 种药用植物中筛选抗突变中草药。

本文对 21 种常用中草药的 60 %乙醇提取物进行了抗 Trp-P-1 致突变活性的研究,发现抗 Trp-P-1 致突变活性 80 %以上的有 7 种,它们是猫人参、黄药子、山偏柏、半支莲、五加皮、花椒,占试验总数的 28 %。

## 材料与方法

### 1 中药材

以上 21 种中草药(名称见表)选购于杭州和磐安县医药公司,并经主管中药师鉴定。所有材料在提取前经过筛、蒸馏水淋洗,有的经过粉碎和剪切。

### 2 60 %乙醇提取物的准备

每种药材取样量 48 ~ 50g,用 60 %乙醇 400 ~ 500ml(草药体积大的采用 500ml)浸泡,水浴 100 °C 下回流提取三次,每次 1h,分离过滤后旋转蒸发器减压蒸馏浓缩,然后冷冻真空干燥。

### 3 试液准备

准确称取每种提取物 100mg,溶于 2ml DMSO (dimethyl sulfoxide 即二甲亚砜)溶液中,(试样瓶及吸量管予先在 121 °C、1.1 大气压下的高压锅内灭菌 20min),每次每试管取样量为 0.1ml,即每皿浓度为 5mg/0.1ml DMSO。

### 4 Trp-P-1<sup>(10)、(11)</sup>(变异原性物质)准备

Trp-P-1 储备液浓度为 1200μg/ml,用消毒灭菌蒸馏水稀至 9μg/ml。每皿用量 0.1ml,即 0.9μg。Trp-P-1 由日本岐阜药科大学提供。购于 Wako pure Co. Ltd.osaka(Japan)(日本大阪)。选用 Trp-P-1 作

为诱变剂模型是因为 Trp-P-1 是一种色氨酸的诱变高温溶胞产物(pyrolysate),且容纳于烹调食品之系列中。

### 5 沙门氏菌株,TA98

每试管加 0.1ml 作为 Ames 系统进行抗 Trp-P-1 致突变活性的生物测定。

### 6 抗突变活性试验

依据 Ames 试验评估 Trp-P-1 的诱变活性的改变。每试管加入 5mg/0.1ml DMSO 溶液,0.1ml Trp-P-1(0.1ml 蒸馏水中含 0.9μg Trp-P-1),0.5ml S<sub>9</sub> 混合物调整液,S<sub>9</sub> 由多氯联苯诱发(Aroclor-1254 诱导),S<sub>9</sub> 混合液的组成成分是 1ml S<sub>9</sub>,0.2ml 0.4mol MgCl<sub>2</sub>,0.2ml 0.65mol 的 KCl,17.00mg 的 G-6-P(葡萄糖-6-磷酸),30.52mg NADH(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸,购于和光纯药工业株式会社,日本大阪),36.24mg NADPH(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸,购于和光纯药工业株式会社,日本大阪)。5.00ml 0.2mol 磷酸二氢钠缓冲液(pH7.4),3.6ml 蒸馏水以及 0.1ml 细菌悬胶(沙门氏菌 TA98 5 × 10<sup>5</sup> 细胞/ml),被混合后在 37 °C 恒温摇动孵化 20min,孵化了的混合物用 3ml 柔和的琼脂倾注于 MGAM (Minimal Glucose Agar Midium)培养基的培养皿中混合,于 37 °C 下孵化 48h,计算回变菌落数,每样品准备三皿记录平均值。

抗 Trp-P-1 致突变活性测定用下面方程计算:

$$A.A. \% = 1 - \frac{(S - N)}{(P - N)} \times 100 \%,^{(9,11)}$$

A.A. %,抗 Trp-P-1 致突变活性,

S,试样和 Trp-P-1 的回复突变菌落数,

N,自发回变菌落数,

P,Trp-P-1 的回复突变菌落数。

## 结果与讨论

中草药的植物来源、实验使用部位,实验结果(A.A %)见相对应的图表。A.A %按抗 Trp-P-1 致突变活性从大到小的顺序排列。

不同样品对诱变物质 Trp-P-1 致突变性的有不同的作用。

表 1 21 种中草药 60%醇提取的物质抗 Trp-P-1 致突变性

植物来源	使用部分	抗致突变活性 %	(S - N) / (P - N)
<i>Actinidia valvata</i> Dunn. 猫人参	根	98	(32 - 19) / (880 - 19)
<i>Dioscorea bulbifera</i> L. 黄药子	根	97	(45 - 19) / (88 - 19)
<i>Aristolochia manshuriensis</i> Kom. 关木通	茎	96	(51 - 19) / (880 - 19)
<i>Selaginella doederleinii</i> Hieron. 山偏柏	茎	96	(63 - 28) / (880 - 19)
<i>Scutellaria rivularis</i> Wall. 半支莲	草	94	(72 - 19) / (880 - 19)
<i>Acanthopanax gracilistylus</i> W. W. 五加皮	茎皮	93	(80 - 28) / (800 - 28)
<i>Zanthoxylum bungeanum</i> Maxim. 花椒	果实	83	(172 - 28) / (800 - 28)
<i>Lonicera japonica</i> Thunb. 金银花	花	33	(600 - 19) / (880 - 19)
<i>Cyathula officinalis</i> Kuan. 川牛膝	茎	0	(220 - 34) / (220 - 34)
<i>Lobelia chinensis</i> Lour. 半边莲	草	-22.0	(260 - 34) / (220 - 34)
<i>Paris polyphylla</i> Smith var. <i>Chinensis</i> Franch. 七叶一枝花	根	-35.9	(285 - 34) / (220 - 34)
<i>Solanum nigrum</i> L. 龙葵	茎	-53.8	(124 - 34) / (220 - 34)
<i>Curcuma zedoaria</i> (Berg.) Rosc. 莪术	茎	-222	(2500 - 28) / (880 - 28)
<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidz. 白术	茎	-246	(3000 - 19) / (880 - 19)
<i>Mongolicum</i> Hand. Mazz. 蒲公英	草	-317	(810 - 34) / (220 - 34)
<i>Pseudostellaria heterophylla</i> (Miq) Pax et Peck et Hoffm. 太子参	根	-414	(994 - 34) / (220 - 34)
<i>Akebia trifoliata</i> (Thunb.) Koidz. var. <i>Ustralis</i> (Diels) Rehd. 八月扎	果实	-415	(4000 - 28) / (800 - 28)
<i>Comus officinalis</i> Sieb. et Zucc. 山茱萸	茎	-479	(4500 - 28) / (800 - 28)
<i>Bolyporus mbellatus</i> (Pers.) Fr. Rhizome 猪苓	真菌	-544	(5000 - 28) / (800 - 28)
<i>Lilium brownii</i> F. E. Br. var. <i>Colchesteri</i> Wils. 百合	根	-742	(1600 - 34) / (220 - 34)
<i>Viola inconspicua</i> Bl. 紫花地丁	花	-930	(1950 - 34) / (220 - 34)

S: numbers of revertants when the plant extract and Trp-P-1 were added to s. typhimurium TA98.

N: numbers of revertants by spontaneous mutation.

P: numbers of revertants by Trp-P-1 only.

A.A.% and C.A.% Sample No.: 1-9

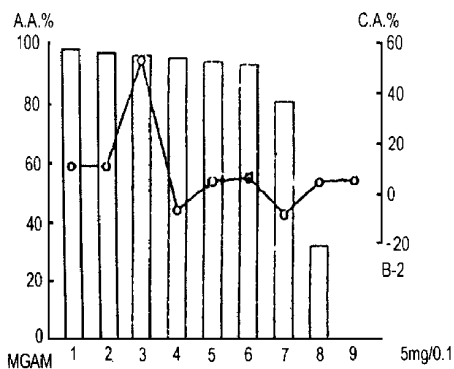


Figure 1 Antimutagenic activity on the Trp-P-1 and cytotoxicity of 60% EtOH extracts from 10 kinds of Chinese medicinal plants.

由图 1、表 1 可以看到 No. 1 ~ 7 (猫人参、药子、关木通、山偏柏、半支莲、五加皮、花椒) 它们的抗 Trp-P-1 致突变性在 80% 以上, 也就是说乙醇提取试样能降低 Trp-P-1 对 TA98 的致突变性。仅仅很小的中药剂量, 就有较强的抗 Trp-P-1 致突变活性。

A.A.% and C.A.% Sample No.: 10-21

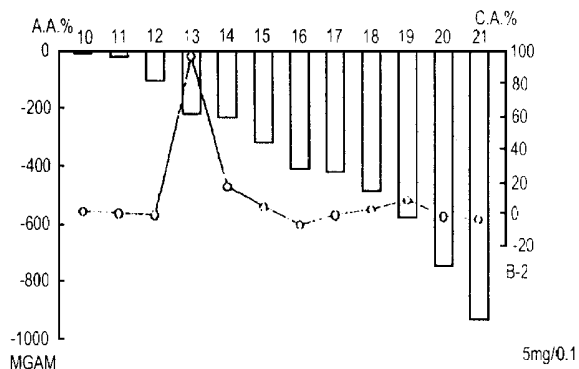


Figure 2 Antimutagenic activity on the Trp-P-1 and cytotoxicity of 60% EtOH extracts from 11 kinds of Chinese medicinal plants.

从图 2、表 1 中也可以看到序号 10 ~ 21 试样有增强 Trp-P-1 的致突变性作用。

实验研究表明提取工艺的改变, 实验结果将不一样, 例如莪术的水提取试样有一定的抗 Trp-P-1 的致突变活性, 但是乙醇水溶液的提取试样却有增加 Trp-P-1 对 TA98 诱变作用。又如川牛膝水提取试样有较强的抗 Trp-P-1 的致突变活性, 而其乙醇水溶液的提取物, 没有抗 Trp-P-1 的致突变活性 (见表 2)。

表 2 川牛膝、莪术水提取物质的抗 Trp-P-1 致突变活性

植物来源	使用部分	抗致突变活性 %	(S - N) / (P - N)
<i>Cyathula officinalis</i> Kuan (川牛膝)	茎	98	(53 - 53) / (546 - 33)
<i>Curcuma edoaria</i> (Berg.) Rosc. (莪术)	根	42	(180 - 23) / (295 - 23)

S: numbers of revertants with plant extract and Trp-P-1 were added to s. typhimurium TA98.

N: numbers of revertants by spontaneous mutation.

P: numbers of revertants by Trp-P-1 only.

我们对花椒的冷冻真空干燥试样, 分别以乙酸乙酯、正丁醇萃取, 然后经旋转蒸发仪减压干燥成成品、进行试验, 发现花椒的有效成分在乙酸乙酯、正丁醇中都存在, 但在乙酸乙酯中的有效成分 > 0.3mg/ 每

皿则明显见效,而在正丁醇部件中的有效成分要 > 0.6mg/ 每皿方可见效(见图 3、4)。猫人参有效成份存

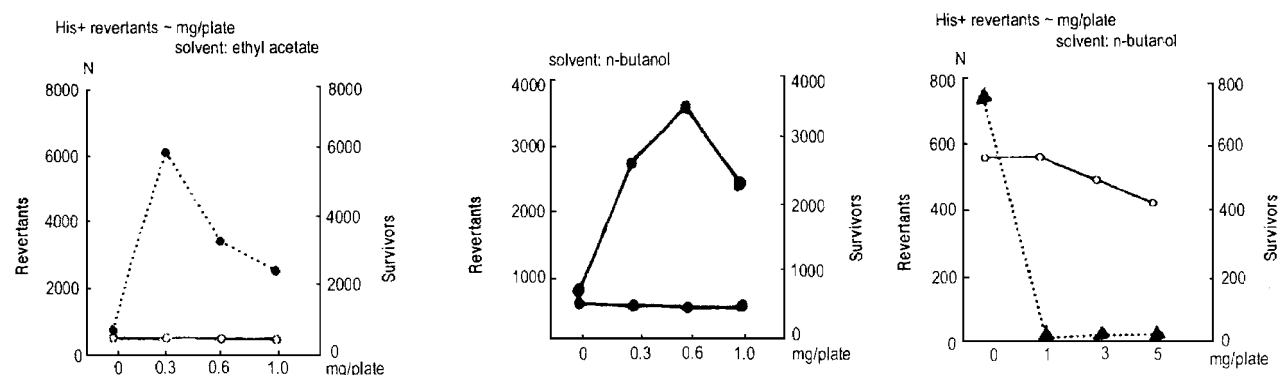


Figure 3, 4, 5 Dose-response relationship between the amount of extracts and the mutagenicity of Trp-P-1.

0.9µg of Trp-P-1 and 0.5ml of S<sub>9</sub> mix were added to one plate. Salmonella typhimurium TA98 strain was used

—•— Zanthoxylum bungeanum Maxim. (花椒), ○— survival colonies on TA98

—●— Actinidid valvata Dunn. (猫人参)

对于以上六种中草药的化学成分经初步检定主要有生物碱类、萜类、皂甙和甾醇类等。猫人参、山偏柏、半枝莲有生物碱类物质存在;黄药子、关木通、半枝莲、山偏柏、五加皮也含有甙类化合物,另外黄药子还有萜类、花椒有甾醇等主要成分。实验中我们观察到提取物质 DMSO 的有色试液中加入 Trp-P-1 时,有的出现颜色改变,这说明 Trp-P-1 与试样中某一种或几种组分发生了化学反应,破坏了原试液某些化合物的呈色结构,而 Trp-P-1 本身可能转化生成另外一种失去了致突变性的新化合物。至于抗 Trp-P-1 致突变的活性成分有的目前正在进一步提取分离和动物试验。

## 参考文献

- Rynichiro Ishii, Kentaro Yoshikawa, et al. Specificities of Bio-antimutagens in plant Kingdom. *Agric Biol Chem*, 1984;48:2587
- Takahiko Sato, Yoshifumi Suzuki, et al. Desmutagenic substance in water extracts of grass-wreck pondweed. *Mutat Res*, 1984;129:33
- Morita K, Hara M, et al. Studies on natural desmutagens: screening for vegetable and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from amino acids. *Agric Biol Chem*, 1978;42:1235
- Yoshimichi Sakai, Hisamitsu Nagase, et al. Antimutagenicity of extracts from crude drugs in Chinese Medicine. *Mutat Res*, 1986;174:1
- Takako Fujimoto, Takahiko Sato, et al. Antimutagenic factors in aquatic plants. *Mutat Res*, 1987;178:211
- Yoshimichi Sakai, Hisamitsu Nagase, et al. Effects of medicinal plant extracts from Chinese herbal medicines on the mutagenic activity of benzo a pyrene. *Mutat Res*, 1988;206:327
- Yoshimichi sakai, Hisamitsu Nagase, et al. inhibitoory action of peony root extract on the mutagenicity of benzo a pyrene, et al. *Mutat Res*, 1990;244:129
- Ames BN, Mccann J, et al. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/ mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res*, 1975;31:347
- Meng Zher-Mu, Yoshichi Sakai, et al. Antimutagenic activity by the medicinal plants in Traditional Chinese Medicines. *Shoyakugaku Zasshi*, 1990;41(3):225
- Miki Niikawa, Yohimichi Sakai, et al. Enhancement of the mutagenicity of Trp-P-1, Trp-P-2 and Benzo a pyrene by Bupleuri Radix Extract. *Chem Pharm Bull*, 1990;38(7):2305
- Takahiko sato, Youkri Ose, et al. Mechanism of antimutagenicity of aguatic plant extracts against benzo a pyrene in the salmonell assay. *Mutat Res*, 1990;241:283

(1998 - 10 - 10 收稿;1999 - 04 - 14 修回)

## 河北省环境诱变剂学会已被首批核准重新登记

河北省环境诱变剂学会,经河北省民政厅按照国务院颁发的《社会团体登记管理条例》规定进行审核,认定符合各项标准,准予重新登记,并于近日换发了《社会团体法人登记证书》和机构代码证书。挂靠单位及办公地点为河北省肿瘤研究所。

(赵泽贞 供稿)