

Ames 方法检验冬虫夏草口服液

中国药品生物制品检定所 (北京) 王晓虎 胡燕平 林飞

冬虫夏草是我国传统的滋补药,是常用的名贵中药之一。最早见于吴仪洛的《本草从新》记载:“虫草甘平,镇痛,化痰,已劳咳”。后来赵学敏在《本草纲目拾遗》^[1]中较详细地汇总了冬虫夏草的作用。但是由于天然虫草产量低,自然生长条件要求高,因此,长期处于供不应求的状态。近年来,很多单位开展了人工培养虫草菌丝代替天然虫草的研究工作。对于人工发酵菌丝的使用是否安全,本研究进行了体外短期致突变试验——Ames 试验,报道如下:

材 料

药品 人工培养冬虫夏草口服液——蝙蝠蛾拟青霉(*Paecilomyces hepiali* Chen et Dai)炮制。(1) 86008批号, (2) 870012批号,均由中医研究院中药研究所提供。

溶剂和对照剂 生理盐水,4-硝基喹啉,正定霉素,噻替派,丝裂霉素C,吡啶橙。

方 法

测试菌株 鼠伤寒沙门氏菌组氨酸营养缺陷型突变株——TA97,TA98,TA100,TA102,共四株,由本所 Ames 实验室提供,经鉴定,菌株符合生物学特性要求。试验菌株经液氮速冻后常规贮存于-80℃冰箱中,试验前一天取5 ml 增菌液溶于人型增菌管中,并接种细菌,细菌在37℃振荡培养箱中振荡培养13小时后,用予培养法进行实验,在正式试验前做受检物最大剂量测定,间隔

一定浓度设6个剂量组,另加阴性对照组和阳性对照组。试验平皿经37℃孵育48小时后,计数回变菌落数。如果试验平皿的回变菌落数高于阴性对照组两倍以上,并有剂量仅应关系或某一部量的可重复性,则判为诱变阳性;反之,为阴性。^[2,3,4]

结 果

在试验条件一致的情况下,重复实验两次,取回变菌落数计数 $\bar{x} \pm SD$,在有或无代谢活化的条件下判断阳性突变剂:4-硝基喹啉,正定霉素,噻替派,丝裂霉素C,吡啶橙均获得阳性结果,而冬虫夏草口服液在100~50,000 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 的浓度范围内,870012批号的回变菌落数在有或无体外活化的条件下均未超过阴性对照组的两倍,因此,判断 Ames 试验结果为阴性(表1)。而86008批号的回变菌落数在无体外代谢活化的条件下,TA100,TA98,TA102,在第一、第二剂量均超过阴性对照组的两倍以上,并有剂量仅应关系,所以,判断86008批号为 Ames 试验阳性(表2)。

讨 论

中医研究院中药研究所研制的冬虫夏草口服液,86008批号和870012批号在 Ames 试验中出现阳性和阴性结果,分析其原因:据调查中医研究院中药所研制的冬中夏草菌丝口服液,86008批号的生产,是在工厂中进行的,在配制培养液的过程中,加入了已长霉

表 1 870012批号冬虫夏草口服液 Ames 试验结果

浓度 ($\mu\text{g}/\text{皿}$)	菌 株 回 变 菌 落 数 ($\bar{x} \pm \text{SD}$)							
	TA97		TA98		TA100		TA102	
	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉
50,000	217.5 $\pm$ 26.2	245.0 $\pm$ 7.1	36.3 $\pm$ 3.5	50.7 $\pm$ 11.2	190.5 $\pm$ 2.1	167.0 $\pm$ 43.8	316 $\pm$ 26.2	465.0 $\pm$ 9.9
25,000	179.0 $\pm$ 15.6	218.0 $\pm$ 2.8	28.7 $\pm$ 1.5	54 $\pm$ 5.7	181.0 $\pm$ 18.4	155.0 $\pm$ 50.9	268 $\pm$ 29.7	430.0 $\pm$ 2.8
10,000	161.0 $\pm$ 1.4	182.5 $\pm$ 20.5	19.7 $\pm$ 3.1	46 $\pm$ 3	208.0 $\pm$ 32.5	158.0 $\pm$ 0.00	312 $\pm$ 56.3	434.5 $\pm$ 0.7
5 000	149.5 $\pm$ 10.6	183.5 $\pm$ 2.1	25 $\pm$ 6.1	47.7 $\pm$ 1.2	165.5 $\pm$ 7.8	130.5 $\pm$ 9.2	318 $\pm$ 90.5	354.0 $\pm$ 8.5
1 000	134.0 $\pm$ 25.5	176.0 $\pm$ 2.8	25.7 $\pm$ 6.5	47.7 $\pm$ 1.2	140.0 $\pm$ 14.1	112.5 $\pm$ 2.1	239.5 $\pm$ 21.9	395.0 $\pm$ 32.5
100	104.5 $\pm$ 3.5	172.0 $\pm$ 8.5	33.3 $\pm$ 5.5	45 $\pm$ 5.2	120.0 $\pm$ 25.5	94.0 $\pm$ 5.7	292.5 $\pm$ 40.3	350.5 $\pm$ 17.7
0	126.5 $\pm$ 26.2	176.0 $\pm$ 24	21.3 $\pm$ 6.7	36 $\pm$ 9.2	109.0 $\pm$ 5.7	107.5 $\pm$ 17.7	191.5 $\pm$ 13.4	334.0 $\pm$ 8.5
阳 性	4-硝基喹啉 0.4 $\mu\text{g}/\text{皿}$	吡 啶 橙 40 $\mu\text{g}/\text{皿}$	正定霉素 10 $\mu\text{g}/\text{皿}$	吡 啶 橙 40 $\mu\text{g}/\text{皿}$	噻 替 哌 200 $\mu\text{g}/\text{皿}$	吡 啶 橙 40 $\mu\text{g}/\text{皿}$	丝裂霉素C 0.25/ 皿	吡 啶 橙 40 $\mu\text{g}/\text{皿}$
对 照	480	360	155	122	940	237	1100	1060

表 2 86008批号冬虫夏草口服液 Ames 试验结果

浓 度 ($\mu\text{g}/\text{皿}$)	菌 株 回 变 菌 落 数 ($\bar{x} \pm \text{SD}$)			
	TA97	TA98	TA100	TA102
	-S ₉	-S ₉	-S ₉	-S ₉
50,000	314.0 $\pm$ 19.8	51.5 $\pm$ 19.1	294.5 $\pm$ 12.0	285 $\pm$ 580
25,000	286.0 $\pm$ 28.3	36.0 $\pm$ 9.9	227.5 $\pm$ 6.4	296.5 $\pm$ 78.5
10,000	223.0 $\pm$ 4.2	24.5 $\pm$ 3.5	174.5 $\pm$ 23.3	260 $\pm$ 56.6
5,000	209.0 $\pm$ 1.4	21.0 $\pm$ 0.0	162.0 $\pm$ 1.4	243 $\pm$ 7.1
1,000	135.5 $\pm$ 13.4	19.5 $\pm$ 4.9	146.5 $\pm$ 27.6	260 $\pm$ 5.7
100	159.0 $\pm$ 22.6	19.0 $\pm$ 1.4	128.0 $\pm$ 9.9	241.5 $\pm$ 62.9
0	178.0 $\pm$ 17.3	22.0 $\pm$ 4.2	136.5 $\pm$ 2.1	196. $\pm$ 2.1
阳 性	4 硝基喹啉 0.4 $\mu\text{g}/\text{皿}$	正定霉素 10 $\mu\text{g}/\text{皿}$	噻 替 哌 200 $\mu\text{g}/\text{皿}$	丝裂霉素C 0.25 $\mu\text{g}/\text{皿}$
对 照	480	135	712	1024

菌的蚕蛹，并且在生产过程中发酵罐可能污染，（致使）配制的菌液不纯，在 Ames 试验中，可能混有霉菌所产生的霉素，使试验回复突变菌落数明显增加，呈阳性结果。1987 年将菌丝口服液为中药所自己生产，并且注意创蚕蛹的问题，采用自己的小发酵罐生产，严格控制生产过程，致使 870012 批号的虫夏口服液在 Ames 试验中获得阴性结果。

Ames 试验作为药品及化学品的一种初筛试验已经为全世界所公认，其阳性检出率达 80%，因此，在致变试验中起着非常重要的作用。它是以直接损伤 DnA，引起 DnA

基序列的改变作为终点^[3]。但 Ames 试验的检测方法并不是检测化学品遗传毒性的唯一方法，它具有一定的局限性。用 Ames 检测虫草口服液获得阴性结果，用其它方法检测结果如何，还有待于进一步试验。

参 考 文 献

- [1] 赵学敏等：《本草纲目拾遗》1983 P138~P139 人民卫生出版社。
- [2] 林飞等：中国药理学通报 1985，1(2)，51。
- [3] Maron DM and Ames BN: Mutation Res 1983。
- [4] 林飞等：现代应用药学 1987，4(4):1。
- [5] 黄念君等：中国临床药理学杂志 1985，1(2)，110。