

东紫苏致突变作用的研究

李 姿, 胡嘉想, 刘 敏*

(云南省疾病预防控制中心, 昆明 650022)

摘 要: **目的** 研究东紫苏是否具有致突变作用。**方法** 采用平板掺入法 Ames 试验, 设每皿 5000、1000、200、40、8 μg 剂量组, 同时设阴性、阳性对照组, 观察每皿回变菌落数。微核及精子畸形试验设 5000、2500、1250 $\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ 3 个剂量组、阴性对照组及阳性对照组。微核试验采用 30 h、2 次给受试物法, 检测骨髓嗜多染红细胞微核率。精子畸形试验于首次染毒后第 35 d 处死动物, 观察精子畸形率。**结果** 与阳性对照组比较, 东紫苏各剂量组在 Ames 试验中未呈现致突变性, 骨髓细胞微核试验及小鼠精子畸变试验结果均为阴性, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 在本实验条件和剂量范围内, 未发现东紫苏有致突变性作用。

关键词: 东紫苏; Ames 试验; 微核; 精子畸形; 致突变

Study on mutagenicity of *Elsholtzia bodinieri* Vaniot

LI Zi, HU Jia-Xiang, LIU Min*

(Yunnan Center for Disease Prevention and Control, Kunming 650022, China)

ABSTRACT: Objective To study the potential mutagenicity of *Elsholtzia bodinieri* Vaniot. **Methods** The plate incorporation Ames test was used to observe the number of colonies in each plate at the dose of 5000, 1000, 200, 40, 8 $\mu\text{g}/\text{plate}$; and both negative and positive control were included in the assay. Bone marrow cell micronucleus test and sperm abnormality test were performed in a total of 3 dose groups (5000, 2500, 1250 $\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{BW}$), negative control group and positive control group. Micronucleus test was used to detect the micronucleus frequency of bone marrow polychromatic erythrocytes at 30 h after giving the target for twice. Sperm deformity test was performed on the thirty-fifth day after the first sample and sperm abnormality rate was calculated. **Results** Compared to the positive control group, the treatment group showed an absence of mutagenicity in the Ames test. The results of micronucleus test of bone marrow cells and the sperm aberration test in mice were negative, and no statistical significance was found ($P > 0.05$). **Conclusion** Under the experimental conditions and the designed dose range, *Elsholtzia bodinieri* Vaniot showed no mutagenesis.

KEY WORDS: *Elsholtzia bodinieri* Vaniot; Ames test; micronucleus; sperm deformity; mutagenicity

1 引 言

东紫苏(*Elsholtzia bodinieri* Vaniot)为唇形科香薷属多年生草本植物, 主要产于云南、贵州、青海及甘肃等地区。全草可入药, 主治外感风寒、感冒发热、头痛身痛、咽喉

痛、虚火牙痛、急性结膜炎等^[1,2]。其嫩尖可当茶饮, 具有清热解暑之功效^[3]。据报道, 东紫苏是香薷属植物中唯一可食用的植物品种, 其植株含挥发油, 具有特殊香气, 可用于调香^[4,5]; 其全草中还含有黄酮类、酚类氨基酸、多肽、多糖、苷类等成分以及少量香豆素、木脂素、氰苷、

*通讯作者: 刘敏, 副主任技师, 主要研究方向为食品毒理学安全性评价。E-mail: 108616255@qq.com

*Corresponding author: LIU Min, Associate Chief Technician, Yunnan Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China. E-mail: 108616255@qq.com

有机酸、脂肪烃等^[6-10], 有较高的食用和药用价值^[11,12]。虽然东紫苏可当茶饮, 并存在于多种纯中草药复方制剂中^[13], 但目前对于东紫苏及其所含的化学物质的毒理学安全性研究文献报道较少。

本研究旨在通过 Ames 试验、骨髓细胞微核试验和小鼠精子畸变试验, 检测东紫苏是否具有遗传毒性, 为东紫苏的食用安全性提供一定的科学依据。

2 材料与方法

2.1 材料、试剂与仪器

东紫苏, 由云南某茶叶有限公司提供。取东紫苏 100 g, 用粉碎机粉碎, 过 200 目筛, 所得粉末作为受试物。

试剂: 阳性药物叠氮钠($\geq 99.5\%$)、2-氨基苄(98%)、1,4-二羟基蒽醌(96%)、环磷酰胺(99%)(美国 Sigma 公司); 敌克松(97%, 美国 International laboratory USA 公司); 鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型菌株 TA97、TA98、TA100 和 TA102 及大鼠肝 S-9(美国 Moltax 公司); 姬姆萨染色液及伊红染色液(珠海贝索生物技术有限公司); 胎牛血清(美国 GIBCO 公司)。

仪器: MSC-ADVANTAGE 生物安全柜(美国 Thermo Scientific 公司); DM 5000B 生物显微镜(德国莱卡公司); SX-500 高压灭菌器(日本 TOMY 公司); DW-HL388 低温冰箱(中科美菱公司); AE240 电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); BF240 恒温培养箱(德国 BINDER 公司); DHG-9146A 干烤箱、DK-S28 恒温水浴锅(上海精宏公司); GENIUS 3 微量振荡器(德国 IKA 公司)。

2.2 试验动物

昆明种小鼠, SPF 级, 由重庆医科大学动物实验中心提供, 合格证号: SCXK(渝)2012-0001。

2.3 实验方法

2.3.1 鼠伤寒沙门氏菌试验(Ames 试验)

选取经鉴定符合试验要求的 4 株鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型菌株 TA97、TA98、TA100 和 TA102 进行试验。以大鼠肝 S-9 混合液作为代谢活化系统。根据《保健食品检验与评价技术规范》(2003 版)中剂量设计原则^[14], 试验分别设 5 个剂量组, 各剂量组东紫苏浓度分别为每皿 5000、1000、200、40、8 μg , 同时设溶剂对照(灭菌蒸馏水)、阳性对照(敌克松、叠氮钠、2-氨基苄、1,4-二羟基蒽醌)及空白对照组。采用平板掺入法, 每个菌株每个测试剂量均做 3 个平行皿, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 48 h 后计数每皿回变菌落数。

2.3.2 骨髓细胞微核试验

选取体重为 25 ~ 30 g 健康昆明种小鼠 50 只, 按体重随机分成 5 组, 每组 10 只, 雌雄各半。根据一次最大灌胃剂量, 试验设 5000、2500、1250 $\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ 3 个剂量组、阴性对照组(蒸馏水)及阳性对照组(环磷酰胺 40 $\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{BW}$)。阴性对

照组和 3 个东紫苏剂量组经口灌胃给予受试物, 阳性对照组采用腹腔注射。第 2 次给予受试物 6 h 后, 处死小鼠, 取一侧股骨进行骨髓常规制片。Giemsa 染色后, 选择细胞着色适当, 分散均匀的区域计数。每只小鼠计数 1000 个嗜多染红细胞(polychromatic erythrocytes, PCE)及 PCE 微核发生率, 同时计数每 200 个 PCE 所观察到的成熟红细胞(red blood cell, RBC)数。

2.3.3 小鼠精子畸变试验

选取体重为 30 ~ 35 g 健康雄性昆明种小鼠 25 只, 按体重随机分为 5 组, 每组 5 只。组别及剂量设计同骨髓细胞微核试验。阴性对照组和 3 个东紫苏剂量组以 0.2 $\text{mL}/10 \text{g}\cdot\text{BW}$ 经口连续灌胃 5 d。阳性对照组(环磷酰胺 40 $\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{BW}$)采用腹腔注射, 连续 5 d。从首次给予受试物开始算至第 35 d 处死小鼠, 取其双侧附睾, 撕开包膜, 用吸管反复吸打多次, 悬液制片, 伊红染色。每只小鼠观察 1000 个完整精子, 记录各类畸形精子数, 计算精子畸变率(%)。

2.4 统计学处理

采用 SPSS 统计软件处理数据, 结果以 $\bar{x}\pm S$ 表示, $P < 0.05$ 时, 差异具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 Ames 试验

结果如表 1、表 2 所示, 在本试验条件下, 空白对照组各菌株自发回复突变数均在正常范围内。试验结果显示, 在加与不加 S9 时, 受试样品各剂量组回变菌落数均未见明显增加, 未超过自发回变菌落数的 2 倍及以上, 亦无剂量-反应关系(重复试验结果具有很好的重现性)。试验结果表明, 在本次试验条件下, 东紫苏在 Ames 试验中无致突变性。

表 1 Ames 试验结果($\bar{x}\pm S$)
Table 1 Results of Ames experimental($\bar{x}\pm S$)

组别	TA97		TA98	
	+S9	-S9	+S9	-S9
空白对照组	111.7 \pm 16.0	122.0 \pm 7.5	42.3 \pm 2.1	40.0 \pm 2.6
溶剂对照组	115.7 \pm 14.3	113.0 \pm 22.6	38.0 \pm 2.0	40.7 \pm 3.2
8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	116.0 \pm 6.2	119.3 \pm 2.1	40.3 \pm 1.5	37.3 \pm 3.1
40 $\mu\text{g}/\text{mL}$	113.7 \pm 10.3	113.3 \pm 7.2	36.3 \pm 1.2	37.7 \pm 4.0
200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	119.3 \pm 7.4	122.7 \pm 19.4	36.3 \pm 7.5	40.3 \pm 3.2
1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	116.3 \pm 8.7	114.7 \pm 6.8	35.0 \pm 4.4	38.7 \pm 6.1
5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	122.0 \pm 17.3	116.0 \pm 7.0	35.0 \pm 3.5	38.3 \pm 3.8
阳性对照组	1751.0 \pm 59.3**	2692.0 \pm 149.4**	6146.0 \pm 90.7**	1152.0 \pm 111.3**

注: 与溶剂对照组比较, ** $P < 0.01$ 。阳性对照物: TA97、TA98-S9 用敌克松 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。TA97、TA98 +S9 用 2-氨基苄 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 2 Ames 试验结果($x \pm S$)
Table.2 Results of Ames experimental($x \pm S$)

组别	TA100		TA102	
	+S9	-S9	+S9	-S9
空白对照组	141.3±25.0	173.0±17.3	271.7±24.8	266.3±31.8
溶剂对照组	140.7±20.4	149.7±16.9	285.0±21.5	288.0±26.9
8 μg/皿	140.7±5.5	163.7±15.2	268.7±18.1	285.0±20.7
40 μg/皿	140.0±13.5	139.7±5.7	290.3±25.1	278.3±21.0
200 μg/皿	140.0±16.5	136.0±13.1	274.7±7.6	273.7±12.9
1000 μg/皿	139.7±9.3	146.3±9.0	284.3±23.5	264.7±23.8
5000 μg/皿	133.3±8.1	144.7±10.3	267.3±16.0	286.3±16.5
阳性对照组	3112.0±134.7**	2964.0±86.6**	910.3±24.0**	881.0±37.7**

注: 与溶剂对照组比较, ** $P < 0.01$ 。阳性对照物: TA100-S9 用叠氮钠 1.5 μg/皿, TA102-S9 用敌克松 50 μg/皿。TA100 +S9 用 2-氨基芴 10 μg/皿, TA102 +S9 用 1,4-二羟基蒽醌 50 μg/皿。

3.2 骨髓细胞微核试验

结果如表 3 和表 4 所示, 雄性及雌性小鼠东紫苏各剂量组 PCE/RBC 均在正常值范围内, 未明显少于阴性对照组, 说明实验染毒剂量合适。阳性对照组微核率与溶剂对照组及各剂量组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$), 阳性对照组和溶剂对照组的微核率均在本实验室以往的正常值范围内, 说明实验结果可靠。东紫苏 3 个剂量组微核率与阴性对照组比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$), 结果表明, 在本次实验条件下, 东紫苏未使小鼠骨髓 PCE 微核率发生明显改变。

3.3 小鼠精子畸变试验

如表 5 所示, 各剂量组小鼠精子畸形率未出现明显增加, 与阴性对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。提示在本实验条件下, 未见东紫苏有致小鼠精子畸形作用。

表 3 雄性小鼠骨髓细胞微核试验结果($x \pm S$)
Table.3 Results of male mouse bone marrow micronucleus test($x \pm S$)

组别	动物数/只	观察 PCE 数	微核数	微核率/%	PCE/RBC
阴性对照组	5	1000×5	14	2.8	1.00±0.189
1250 mg/(kg·BW)	5	1000×5	13	2.6	1.07±0.160
2500 mg/(kg·BW)	5	1000×5	8	1.6	1.01±0.085
5000 mg/(kg·BW)	5	1000×5	13	2.6	0.97±0.171
阳性对照组	5	1000×5	98	19.6**	0.89±0.065

注: 与阴性对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

表 4 雌性小鼠骨髓细胞微核试验结果($x \pm S$)
Table.4 Results of female mouse bone marrow micronucleus test($x \pm S$)

组别	动物数/只	观察 PCE 数	微核数	微核率/%	PCE/RBC
阴性对照组	5	1000×5	9	1.8	1.09±0.140
1250 mg/(kg·BW)	5	1000×5	10	2.0	1.08±0.081
2500 mg/(kg·BW)	5	1000×5	13	2.6	1.07±0.102
5000 mg/(kg·BW)	5	1000×5	10	2	0.86±0.054
阳性对照组	5	1000×5	101	20.2**	0.96±0.104

注: 与阴性对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

表 5 小鼠精子畸变试验结果($x \pm S$)
Table.5 Sperm shape abnormality test of mice($x \pm S$)

组别	动物数/只	观察精子数(n)	畸形精子数(n)	畸变率/%	P 值
阴性对照	5	1000×5	56	1.12	-
1250 mg/kg	5	1000×5	55	1.10	0.924
2500 mg/kg	5	1000×5	61	1.22	0.651
5000 mg/kg	5	1000×5	59	1.18	0.783
阳性对照组	5	1000×5	259	5.18**	0.000

注: 与阴性对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

4 结论与讨论

东紫苏作为香薷属植物中唯一可食用的植物品种, 其中含有丰富的黄酮、甾体及三萜类化合物, 具有较强的清除自由基、抑菌、降糖及降血脂作用; 东紫苏中还富含β-胡萝卜素, 具有强抗氧化作用及抗癌、抗衰老、防辐射及防止心血管疾病等功效^[9], 因此, 东紫苏具有很大的开发价值及潜力。目前有关东紫苏安全性评价方面的报道较少, 本研究选用 Ames 试验、骨髓细胞微核试验和小鼠精子畸变试验, 从细菌回复突变、生殖细胞形态改变和体细胞微核形成 3 个不同角度对东紫苏进行了致突变性的评价为东紫苏的食用安全性提供一定的科学依据。

Ames 试验用于检测有害物质的体外致突变性, 主要检测的遗传学终点为基因的碱基置换和移码突变, 具有快速、有效、经济的特点。本研究中, Ames 试验结果显示, 受试物各剂量组在加与不加 S9 时回变菌落数均未见明显增加, 与自发回变菌落数之比均小于 2, 亦无剂量-反应关系, 表明东紫苏在 Ames 试验中未呈现致突变性。骨髓细胞微核试验是一种用于检测细胞内染色体损伤的化学毒物的试验方法^[15,16]。东紫苏骨髓细胞微核试验中, 3 个剂量组与阴

性对照组比较差异均无统计学意义,表明在本实验条件下,未发现东紫苏导致小鼠微核发生率增加。小鼠精子畸形具有高度遗传性,精子畸形率的高低可反映该化学毒物对生殖细胞遗传物质的损害。小鼠精子畸变试验结果为阴性,各剂量组小鼠精子畸形率未出现明显增加,表明在本试验条件下,东紫苏不引起哺乳动物遗传毒性。本次研究结果表明,在本实验条件和剂量范围内,未发现东紫苏致突变作用。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第 60 卷)[M]. 北京: 北京科学出版社, 1977.
Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agenda Academiae Sinicae Edita. Flora reipublicae popularis sinicae (volume 60) [M]. Beijing: Beijing Science Press, 1977.
- [2] 吴永贵, 唐正平. 东紫苏的部分药效学实验研究[J]. 现代中药研究与实践, 2009, 23(1): 51-53.
Wu YG, Tang ZP. Experimental study of pharmacodynamics of *Elsholtzia bodinieri vaniot* [J]. Res Pract Chin Med, 2009, 23(1): 51-53.
- [3] 王春梅, 龙平, 许利嘉, 等. 凤尾茶的来源及近代研究[J]. 中国现代中药, 2013, 15(3): 250-255.
Wang CM, Long P, Xu JL, et al. The origin and recent research progress on Fengwei tea [J]. Mod Chin Med, 2013, 15(3): 250-255.
- [4] 付立卓, 李海舟, 李蓉涛. 2 种香薷属植物挥发油成分分析[J]. 昆明理工大学学报: 理工版, 2010, 35(1): 88-92.
Fu LZ, Li HZ, Li RT. Constituent analysis of two *Elsholtzia volatile oils* [J]. J Kunming Univ Sci Technol (Sci Technol Ed), 2010, 35(1): 88-92.
- [5] Chen HY, Fan J, Cao JX. Determination of flavones in *Elsholtzia bodinieri* by HPLC [J]. China J Chin Mater Med, 2007, 32(22): 2385-2387.
- [6] 陈钟文, 吴文茂, 刘华, 等. 药用香薷类植物化学成分的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 260-264.
Chen ZW, Wu WM, Liu H, et al. Review of chemical constituents of medicinal herbs herba moslae [J]. Chin J Exp Trad Med Formul, 2011, 17(24): 260-264.
- [7] Zhao D, Yang Y, Zhang W, et al. Studies on chemical constituents from *Elsholtzia bodinieri Vaniot* [J]. China J Chin Mater Med, 2005, 28(2): 94-96.
- [8] Zhong JD, Feng Y, Li HM, et al. A new flavonoid glycoside from *Elsholtzia bodinieri* [J]. Nat Prod Res, 2016, 30(20): 2278-84.
- [9] 毛媛, 刘克武, 刘克海, 等. 东紫苏化学成分研究概述[J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(3): 134-136.
Mao Y, Liu KW, Liu KH, et al. Review of chemical constituents of *Elsholtzia bodinieri vaniot* [J]. Chin J Inf Trad Chin Med, 2016, 23(3): 134-136.
- [10] 钟金栋, 冯峰, 李洪海, 等. 东紫苏的化学成分研究[J]. 昆明理工大学学报: 自然科学版, 2013, 38(5): 75-100.
Zhong JD, Feng F, Li HH, et al. Chemical constituents from *Elsholtzia bodinieri vaniot* [J]. J Kunming Univ Sci Technol (Nat Sci Ed), 2013, 38(5): 75-100.
- [11] 邹海舰, 唐自明, 韦群辉, 等. 凤尾茶的生药研究[J]. 中国民族民间医药杂志, 1999, 8(6): 359-363, 369.
Zou HJ, Tang ZM, Wei QH, et al. Pharmacognositive studies of *Elsholtzia bodinieri vaniot* [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm, 1999, 8(6): 359-363, 369.
- [12] 赵明霞. 东紫苏的药用成分及功能分析[J]. 中国民族民间医药, 2009, 18(21): 15.
Zhao MX. Analysis of the medicinal components and functions of *perilla frutescens* [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm, 2009, 18(21): 15.
- [13] 许东航, 徐翔, 陈翠萍. 藿香正气胶囊的体外溶出度研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(14): 1201-1202.
Xu DH, Xu X, Chen CP. Study on dissolution of *huoxiang zhengqi capsules in vitro* [J]. China J Chin Mat Med, 2006, 31(14): 1201-1202.
- [14] 保健食品检验与评价技术规范[S].
Technical standards for the testing & assessment of health food [S].
- [15] 刘敏, 李姿, 秦光和, 等. 一种微生物絮凝剂急性毒性和诱变毒性作用的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(10): 3805-3808.
Liu M, Li Z, Qin GH, et al. Acute toxicity and mutagenicity of a microbial flocculant [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(10): 3805-3808.
- [16] 李寿祺. 毒理学原理与方法第 2 版[M]. 成都: 四川大学出版社, 2003.
Li SQ. Principles and methods of toxicology (2nd Ed) [M]. Chengdu: Sichuan University Press, 2003.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



李姿, 主管技师, 主要研究方向为食品毒理学安全性评价。

E-mail: 63248889@qq.com



刘敏, 副主任技师, 主要研究方向为食品毒理学安全性评价。

E-mail: 108616255@qq.com