

鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶试验检测 生命壹号口服液安全性

郝钢*, 韩峰, 周刚, 盛惟

(内蒙古自治区食品药品检验所, 呼和浩特 010020)

摘要: **目的** 采用鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶试验(Ames)对生命壹号口服液进行安全性毒理学试验。**方法** 实验选用鼠伤寒沙门氏菌 TA97、TA98、TA100 和 TA102 菌株, 将生命壹号口服液配制浓度为 50000、10000、2000、400、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液, 作为 5 个剂量组, 同时设未处理对照组、溶剂对照组(二甲基亚砜)和阳性对照组(2-乙酰氨基苄、4-硝基喹啉-N-氧化物), 观察各菌株的回变菌落数。**结果** 生命壹号口服液 Ames 试验各剂量组的回变菌落数均未超过未处理对照组自发回变菌落数的 2 倍, Ames 实验结果为阴性。**结论** 在本实验条件和剂量范围内, 未观察到生命壹号口服液对鼠伤寒沙门氏菌 TA97、TA98、TA100、TA102 的诱变作用。

关键词: 鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶试验; 遗传毒性; 诱变; 生命壹号口服液

Safety test of life one oral liquid by *Salmonella typhimurium*/mammalian microsomal enzyme test

HAO Gang, HAN Feng, ZHOU Gang, SHENG Wei

(Inner Mongolia Institute for Food and Drug Control, Hohhot 010020, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the safety toxicology test of life one oral liquid by *Salmonella typhimurium*/mammalian microsomal enzyme test (Ames). **Methods** *Salmonella typhimurium* strains of TA97, TA98, TA100 and TA102 were selected, and oral solution was prepared into concentrations of 50000, 1000, 2000, 400, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ as for the 5 dose groups. The untreated control group, solvent control group and positive control groups were set to observe the number of colonies of each strain. **Results** In the Ames test, the number of converted colonies in each dose group was no more than 2 times of that of the untreated control group. The results of Ames test were negative. **Conclusion** In the experimental conditions and dose range, the effect of life one oral liquid on TA97, TA98, TA100 and TA102 of *Salmonella typhimurium* is not observed.

KEY WORDS: *Salmonella typhimurium*/mammalian microsomal enzyme test; genetic toxicity; mutation; life one oral liquid

1 引言

食品安全问题是关系到人民健康和国计民生的重大

问题, 而食品安全性毒理学评价则是针对某种食品的食用安全性展开的评价, 包括新资源食品、保健食品、食品添加剂、转基因食品、食品容器和包装材料及食品中各种化

*通讯作者: 郝钢, 主管药师, 主要研究方向为药理学。E-mail: 39935313@qq.com

*Corresponding author: HAO Gang, Pharmacist, Inner Mongolia Institute for Food and Drug Control, Hohhot 010020, China. E-mail: 39935313@qq.com

学和生物等的污染物^[1]。随着保健食品行业的发展,原料的应用也越来越广泛,以复方为主,多运用传统中医辩证理论组方,其各种功效成分的协同、拮抗作用,功效成分及功能之间的关联性以及功效成分的配伍之间的毒性作用等尚不明确,因此,对保健食品的安全毒性研究应高度重视。

鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶(亦称 Ames 试验)已被世界各国广为采用,该方法具有快速、简便、敏感、经济等特点,且适用于测试混合物,能反映多种污染物的综合效应,是应用最为广泛的检测基因突变的体外实验^[2]。根据我国卫生部《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)^[3]的要求,为评价生命壹号口服液的安全性,对生命壹号口服液进行鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶研究^[4-15]。

2 材料和方法

2.1 材料及菌株

2.1.1 材料与试剂

生命壹号口服液,广东生命一号药业有限公司,批号:20140101。

鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型 TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535 试验菌株均购自美国 MOLTOX 公司。

营养肉汤培养基、营养琼脂培养基(印度 HIMEDIA 公司);*D*-生物素、*L*-组氨酸、氧化型辅酶 II、葡萄糖-6 磷酸二钠(中国 RUITAIBIO 公司);氨苄青霉素、2-乙酰氨基苄、4-硝基喹啉-*N*-氧化物、1,8-二羟蒽醌(日本 TCI 公司);四环素(美国 AMRESCO 公司);雄性 SD 大鼠肝脏微粒体酶-S9(美国 MOLTOX 公司)。

2.2 试验仪器

AE100 电子天平(英国梅特勒-托利多公司);BSC-1100 生物安全柜(中国 Biobase 公司);SX-700 高压灭菌器(日本 TOMMY 公司);ZWY-211B 恒温培养振荡器(上海智诚公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 增菌培养

取无菌试管 5 支,加入灭菌营养肉汤培养基各 10 mL,分别加入 TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535 5 株菌的菌种颗粒各 2 粒,37 °C 静置培养至每 1 mL 不少于 1×10^9 个活菌数,培养管用铝箔纸包裹,避免光线照射。

2.3.2 菌株鉴定

(1)组氨酸缺陷型的鉴定

取有组氨酸和无组氨酸培养基平皿各 1 个,按菌株号顺序划线接种于培养皿表面,37 °C 培养 48 h 后观察。

(2)脂多糖屏障缺陷的鉴定

分别取 TA97、TA98、TA100、TA102 菌液各 0.1 mL 移入 4 个平皿,迅速将营养琼脂培养基适量倒入平皿,混

匀,平放凝固。将无菌滤纸片一片放入已凝固的培养基平皿中央,用移液器在滤纸上滴加 0.1% 结晶紫溶液 10 μ L,37 °C 培养 24 h 后观察。

(3)R 因子的鉴定

用移液器吸取 0.8% 的氨苄青霉素 10 μ L,在凝固的营养琼脂培养基表面依中线涂成一条带,待氨苄青霉素溶液干后,用接种环与氨苄青霉素带相交叉划线接种该 4 种菌株,并接种一个不具有 R 因子的菌株 TA1535 作氨苄青霉素抗性的对照,37 °C 培养 24 h 后观察。

(4)四环素抗性的鉴定

用移液器各吸取 10 μ L 0.8% 的四环素溶液和 0.8% 的氨苄青霉素溶液,在营养琼脂培养基平皿表面依中线涂成一条带,待四环素和氨苄青霉素液干后,用接种环与四环素和氨苄青霉素带相交叉换线接种 TA102 和 TA100,37 °C 培养 24 h 后观察。

(5)UvrB 修复缺陷型的鉴定

在营养肉汤琼脂培养基平皿表面分别划线接种 TA97、TA98、TA100、TA102 4 株菌,接种后平皿一半用黑纸覆盖,在距 15 W 紫外线灭菌灯 33 cm 处照射 8 s,37 °C 培养 24 h 后观察。

(6)自发回变率的测定

在每管 2 mL 的顶层培养基中,分别加入待测定的四株菌的菌液 0.1 mL,一式 2 份,轻轻摇匀,迅速将此试管内容物倾入已固化的底层培养基平皿中,转动平皿,使顶层培养基均匀分布,平放固化,37 °C 培养 48 h 后计数菌落数。

2.3.3 样品配制

取生命壹号口服液 2.008 g,用灭菌水配制成浓度为 50000、10000、2000、400、80 μ g/mL 的溶液,作为 5 个剂量组,同时设未处理对照组、溶剂对照组(二甲亚砜)和阳性对照组(2-乙酰氨基苄,4-硝基喹啉-*N*-氧化物,1,8-二羟蒽醌)。

2.3.4 诱导突变试验

在无菌管中加入 2 mL 顶层培养基,加入增菌液 0.1 mL,混匀;加入受试物 0.1 mL(需活化时另加入 10% S-9 混合液 0.5 mL),再混匀,迅速倾入底层培养基上,转动平皿使顶层培养基均匀分布在底层上,平放固化,每种菌株每个测试浓度设 3 皿平行,在加 S9 和不加 S9 条件下进行实验,37 °C 培养 48 h。计数回复突变菌落数,以超过溶剂对照组回复突变菌落数的 2 倍且有剂量-反应关系作为阳性判断标准。

3 结果和分析

3.1 菌株鉴定结果

3.1.1 组氨酸缺陷型的鉴定结果

4 株菌在有组氨酸培养基平皿表面各生长出一条菌膜,

无组氨酸培养基平皿上无菌膜,表明受试菌株确为组氨酸缺陷型。

3.1.2 脂多糖屏障缺陷的鉴定结果

4 株菌在纸片周围均出现 1 个透明的抑制带,表明 4 株菌均存在深粗型突变。

3.1.3 R 因子的鉴定结果

对照菌株 TA1535 在与氨苄青霉素交叉处有一段生长抑制区;4 株菌 TA97、TA98、TA100、TA102 在氨苄青霉素带的周围依然生长不受抑制,即有抗氨苄青霉素效应,表明该 4 株菌带有 R 因子。

3.1.4 四环素抗性的鉴定结果

TA102 菌株不受抑制,对照菌株 TA100 有一段生长抑制区,表明 TA102 菌株有抗四环素效应。

3.1.5 UvrB 修复缺陷型的鉴定结果

TA97、TA98、TA100 3 株菌仅在没有紫外线照射过的一半生长,TA102 在紫外线照射区仍能生长,表明只有 TA102 菌株具有野生型切除修复酶。

3.1.6 自发回变率的测定结果

4 种菌自发回变菌落数均满足实验要求,结果见表 1。

3.2 诱导突变试验结果

生命壹号口服液对鼠伤寒沙门氏菌回变菌落数的影响见表 2,无论加或不加 S9,阳性对照组的平均回变菌落数均为溶剂对照组的 2 倍以上,说明此试验系统对致突变物敏感。溶剂对照组的平均回变菌落数与未处理对照的回变菌落数相近,说明所用溶剂无致突变作用。样品平均回变菌落数均未超过未处理对照组 2 倍,亦无剂量-反应关系,表明样品对 4 种菌株无诱变作用,Ames 试验结果为阴性,表明生命壹号口服液无致突变的作用。数据采用 SPSS Statistics 19 软件进行统计分析。

4 结论与讨论

在本实验条件和剂量范围内,未观察到生命壹号口服液对鼠伤寒沙门氏菌 TA97、TA98、TA100、TA102 的诱变作用,说明生命壹号口服液无致突变的作用。

保健食品在我国属于一类特殊的食品,在《保健食品注册管理办法》(试行)中有明确的定义:是指声称具有特定保健功能或者以补充维生素、矿物质为目的的食品,即适

表 1 自发回变菌落数
Table 1 Number of self returning colonies

菌株	TA97		TA98		TA100		TA102	
	1	2	1	2	1	2	1	2
平皿号	1	2	1	2	1	2	1	2
自发回变菌落数	85	89	22	19	116	123	341	313
均值	87		20.5		119.5		327	

表 2 生命壹号口服液对鼠伤寒沙门氏菌回变菌落数的影响(菌落数,个/皿, $n=3$)
Table 2 Effect of life one oral liquid on the colony number of *Salmonella typhimurium* (The number of colonies, per dish, $n=3$)

受试物	剂量 ($\mu\text{g}/\text{皿}$)	TA97		TA98		TA100		TA102		
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
剂量组	5000	80.3 \pm 8.1	92.7 \pm 7.5	19.7 \pm 4.7	20.3 \pm 2.1	116.0 \pm 17.5	120.0 \pm 13.0	304.3 \pm 92.9	349.0 \pm 13.5	
	1000	76.3 \pm 5.0	81.3 \pm 7.4	17.7 \pm 0.6	18.3 \pm 4.5	111.0 \pm 13.2	119.3 \pm 15.3	327.3 \pm 65.8	374.3 \pm 23.5	
	200	81.0 \pm 5.6	97.7 \pm 8.0	16.7 \pm 1.2	18.0 \pm 2.6	112.0 \pm 12.8	116.7 \pm 16.5	384.3 \pm 52.9	370.7 \pm 64.0	
	40	85.0 \pm 7.2	100.3 \pm 10.3	18.0 \pm 3.0	17.0 \pm 1.0	119.0 \pm 18.5	117.3 \pm 14.2	365.7 \pm 21.4	380.3 \pm 25.7	
	8	95.7 \pm 5.1	94.3 \pm 11.0	19.7 \pm 3.5	20.3 \pm 4.7	122.7 \pm 11.9	113.0 \pm 14.5	352.0 \pm 26.6	358 \pm 28.8	
阳性 对 照 组	4-硝基喹啉 -N-氧化物	0.5	454.7 \pm 27.6*	/	126.0 \pm 25.1*	/	2306.0 \pm 142.5*	/	1761.3 \pm 224.6*	/
	2-乙酰氨基 基苄	10	/	1378.7 \pm 69.6*	/	1803.3 \pm 189.8*	/	2198.7 \pm 112.0*	/	/
	1,8-二羟 蒽醌	50	/	/	/	/	/	/	/	867.0 \pm 83.4*
	未处理对照组		86.3 \pm 4.5	94.7 \pm 5.5	19.3 \pm 4.2	19.0 \pm 3.6	115.7 \pm 11.0	119.3 \pm 8.1	360.3 \pm 40.7	354.0 \pm 26.5
溶剂对照组		86.3 \pm 6.0	98.0 \pm 5.0	18.7 \pm 1.5	20.0 \pm 3.0	124.0 \pm 4.4	106.7 \pm 9.1	372.0 \pm 18.4	343.7 \pm 19.2	

注:“*”表示超过溶剂对照组突变菌落数 2 倍以上;“/”表示无内容。

宜于特定人群食用,具有调节机体功能,不以治疗疾病为目的,并且对人体不产生任何急性、亚急性或者慢性危害的食品^[16]。保健食品的遗传毒性研究是安全性评价的重要内容,与其他毒理学研究尤其是致癌性研究,生殖毒性研究有着密切的联系,具有重要的意义。保健食品生产企业应提高保健食品注册质量安全意识,增加新型保健食品研发力度,提高开发产品的品质和档次。同时,监管部门也要强化保健食品安全性的要求,严把保健食品上市关^[17]。保健食品与药品最大的不同在于对长期服用的安全性的要求,保健食品不得对人体产生任何危害和毒副作用,这是最基本的前提条件。保健食品安全性评价是保健食品上市的重要环节,需要药监和药检部门高度的关注和严格的审评。

参考文献

- [1] 李宁. 国内食品安全性毒理学评价的现状和发展[J]. 毒理学杂志, 2007, 10(27): 368-370.
Li N. Current status and development of toxicological assessment of food safety in China [J]. J Toxicol, 2007, 10(27): 368-370.
- [2] 邹建勇, 黄秀清, 王金辉等. 遗传毒性检测技术在海洋环境监测中的应用[J]. 海洋环境科学, 2004, 23(7): 77-80.
Wu JY, Huang XQ, Wang JH, et al. Application of genetic toxicity detection technology in marine environmental monitoring [J]. Mar Environ Sci, 2004, 23(7): 77-80.
- [3] 《保健食品检验与评价技术规范》(2003年版)[S].
Technical specification for inspection and evaluation of health food (2003 Edition) [S].
- [4] 王心如. 毒理学基础(4版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
Wang XY. Toxicology foundation (4th Edition) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003.
- [5] 吕全军, 孙锦峰, 张书芳. 某口服液食品安全性毒理学实验[J]. 毒理学杂志, 2005, 19(1): 51-52.
Lv QJ, Sun JF, Zhang SF. Toxicological experiment on food safety of oral liquid [J]. J Toxicol, 2005, 19(1): 51-52.
- [6] 邹文玮, 舒奇, 傅颖媛, 等. 瑞香素毒理实验研究[J]. 中成药, 2013, 35(5): 908-911.
Zou WW, Shu Q, Fu YY, et al. Experimental study on toxicity of Daphne [J]. Chin Pat Med, 2013, 35(5): 908-911.
- [7] 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, 30(3): 499-500.
Qian XW, Liu F, Peng J, et al. Experimental study on genetic toxicity of Angelica sinensis and toad oil tablets [J]. Guangming Tradit Chin Med, 2015, 30(3): 499-500.
- [8] 王雨, 吴克枫, 俞红, 等. 野生水芹的毒理学安全性评价[J]. 食品研究与开发, 2016, 11(37): 196-201.
Wang Y, Wu KF, Yu H, et al. Toxicological safety evaluation of Oenanthe javanica [J]. Food Res Dev, 2016, 11(37): 196-201.
- [9] 王玮, 孙兰, 邹梅, 等. 参茸龟杞口服液急性毒性及遗传毒性的试验[J]. 毒理学杂志, 2005, 9(19): 326.
Wang W, Sun L, Zou M, et al. Test and genetic toxicity of ginseng turtle oral liquid acute toxicity [J]. J Toxicol, 2005, 9(19): 326.
- [10] 曾祥云, 曹志强, 仇仁春, 等. 辽东本草牌参灵片毒性实验研究[J]. 人参研究, 2016, 3: 10-18.
Zeng XY, Cao ZQ, Qiu RC, et al. Experimental study on toxicity of Liaodong herb brand Shen Ling tablet [J]. Ginseng Res, 2016, 3: 10-18.
- [11] 刘晓风, 刘琳, 王晓力, 等. 罂粟籽油毒理学研究与安全性评价[J]. 中国粮油学报, 2014, 5(29): 65-69.
Liu XF, Liu L, Wang XL, et al. Toxicological study and safety evaluation of poppy seed oil [J]. J Chin Cereal Oil Ass, 2014, 5(29): 65-69.
- [12] 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, 32(8): 2002-2004.
Shi AH, Li WD, Zhai PG, et al. Toxicological studies on extracts of American ginseng [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2014, 32(8): 2002-2004.
- [13] 田好亮, 李立, 王勇, 等. 天麻微粉的毒理学安全性评价[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(15): 2161-2164.
Tian HL, Li L, Wang Y, et al. Toxicological safety evaluation of Gastrodia elata powder [J]. Chin J Health Lab, 2014, 24(15): 2161-2164.
- [14] Reshma A, Niclas K, Toufiq R, et al. Assessment of mutagenic potential of pyrolysis biochars by Ames salmonella/mammalian-microsomal mutagenicity test [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2014, 107: 306-312.
- [15] Birgit B, Andreas Z, Peter O. Absence of mutagenic effects of a particular *symphytum officinale* L. liquid extract in the bacterial reverse mutation assay [J]. Phytother Res, 2010, 24(3): 466-468.
- [16] 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]. 药品监管, 2016, 19(7): 352-354.
Zhang WQ, Cao J, Ding H, et al. Thoughts on the establishment of physical and chemical quality standards for health food [J]. Drug Superv, 2016, 19(7): 352-354.
- [17] 武爱香. 保健食品安全需全社会共同保障[J]. 首都食品与医药, 2016, 2: 23.
Wu AX. Health food safety needs the whole society to protect together [J]. Food Med Capital, 2016, 2: 23.

(责任编辑: 姜 珊)

作者简介



郝 钢, 硕士研究生, 主管药师, 主要研究方向为药理学。
E-mail: 39935313@qq.com