

灵芝水提取液抗突变作用实验研究

崔文明 刘泽钦 王 伟 张 馨 李 宁 韩 驰
(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050)

摘 要:为开发灵芝的保健功能,对灵芝水提取液的抗突变作用进行了研究。用小鼠骨髓细胞微核试验、小鼠睾丸染色体畸变试验和体外哺乳动物细胞(V79/HGPRT)试验对灵芝水提取液的抗突变作用进行评价。结果显示,灵芝水提取液对环磷酰胺诱导的小鼠骨髓细胞微核发生率有明显的抑制作用,与对照组相比差异有显著性($P < 0.01$);对丝裂霉素诱导的中国仓鼠 V79 细胞的基因突变有抑制作用,与对照组相比,中、高剂量组的差异均有显著性($P < 0.01$);对环磷酰胺诱导的小鼠睾丸细胞染色体畸变无明显影响。在本试验条件下,灵芝水提取液有一定的抗突变作用。

关键词:灵芝;微核;染色体;基因;抑制;遗传

中图分类号:R15;S576.3⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2002)05-0011-03

灵芝是一种珍贵的药用真菌,古代医学家认为灵芝能治疗多种疾病,是滋阴壮阳,扶正固本的珍贵药物。现代医学研究证明,灵芝具有多方面的生理活性与药理作用。试验研究证明,灵芝具有抗肿瘤、调节机体免疫、降血压、消炎镇静等功效,^[1,4,5]但对其潜在的一些功能仍需进一步研究和开发。本文以小鼠骨髓细胞微核率、小鼠睾丸染色体畸变率和体外哺乳类动物细胞(V79/HGPRT)基因突变率为观察指标,对由灵芝提取物制成的灵芝水提取液的抗突变保健作用进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 灵芝液 将 1 kg 灵芝浸泡在 12 L 水中,加热煮沸 20 min,倒出上清液保留,再加入 8 L 水加热煮沸 20 min,合并提取液,浓缩至 1 000 mL 制成深棕色粘稠状液体。折合人体推荐量每天为 60 mL/kg BW。

1.1.2 试验动物 昆明种小鼠,由中国药品生物制品检定所实验动物中心提供(合格证号:京动管质字(94)079),喂以医科院实验动物所动物繁育场提供的大小鼠普通饲料。

1.1.3 中国仓鼠肺 V79 细胞株 购自中国医学科学院肿瘤研究所。

1.1.4 环磷酰胺 购自北京友谊医院。

1.1.5 秋水仙素 日本进口。

1.1.6 6-TG 美国进口。

1.2 方法 采用卫生部卫生监督司颁布的“保健食品功能评价程序和检验方法”所附方法。

1.2.1 小鼠骨髓细胞微核试验 健康雄性小鼠 40

只,体重为 26.0~28.7 g,随机分为 4 组,致突变物对照组和高、中、低 3 个剂量组,剂量分别为 30、10 和 3.3 mL/kg BW,每组 10 只。经口灌胃给受试物,连续 30 d,灌胃量为 0.4 mL/20 g BW。试验末期(最后 2 d),受试物组及致突变物对照组经口给予致突变物(环磷酰胺 40 mg/kg BW,蒸馏水配制,现用现配)2 次,中间间隔 24 h。第二次给予阳性物 6 h 后颈椎脱臼法处死小鼠,取胸骨骨髓常规制片,每只小鼠计数 1 000 个嗜多染红细胞,计数微核率,以千分率表示。

1.2.2 小鼠睾丸染色体畸变试验 健康雄性小鼠 40 只,体重为 26.0~30.8 g,随机分为 4 组:致突变物对照组和高、中、低 3 个剂量组,每组 10 只。受试物经口灌胃,连续 30 d。高、中、低剂量分别为 30.0、10.0 和 3.3 mL/kg BW,给受试物的第十七天受试物组及致突变物对照组经口给予丝裂霉素 C(2 mg/kg BW,蒸馏水配制,现用现配)1 次,受试物组继续给予受试物 13 d 后,处死动物前腹腔注射秋水仙素 4 mg/kg BW,6 h 后取双侧睾丸,去被膜,分离曲细精管,用 0.1% 的柠檬酸钠低渗,甲醇和冰醋酸(3:1)固定,制片,Gimesa 染色,油镜镜检各组分散良好的初级精母细胞畸变率和染色体畸变类型。

1.2.3 体外哺乳类细胞(V79/HGPRT)基因突变试验 将 5×10^5 个细胞接种于直径为 100 mm 平皿中,于 37℃,5% CO₂ 培养箱中放置 24 h,吸去培养液,PBS 洗 2 次,加入无血清培养液及一定浓度的受试物 MMC(终浓度为 1 mg/L),终浓度高、中和低剂量分别为 50、10、1 mL/L,置于培养箱中 2 h,结束后吸去培养液,换入含 10% 血清的培养液,继续培养 19~20 h、消化计数,以 5×10^5 个细胞接种直径为

100 mm 的平皿,3 d 后传代 1 次,仍接种 5×10^5 个细胞培养 3 d,共表达 6 d。

突变体的选择及集落形成率的测定 表达结束后消化细胞,每组 5 皿,每皿 2×10^5 个细胞,待细胞贴壁后加入 6-TG,终浓度为 $5 \mu\text{g/mL}$ 。培养 8~10 d 后固定,Gemsa 染色,计数每皿集落数并计算突变率。同时另做集落形成率测定,计算集落形成率。突变率(个/ 10^6 存活细胞) = (突变集落数)/[接种细胞数(1×10^6) × 集落形成率]

抑制率 (%) = $\frac{\text{阳性组突变率} - \text{受试物组突变率}}{\text{阳性组突变率} - \text{阴性组突变率}} \times 100\%$

2 结果

2.1 小鼠骨髓细胞微核试验 见表 1,给小鼠灵芝水提取液 30 d 后,低、中、高各剂量组的微核率分别为 23.1%、18.9%、16.8%,均明显低于阳性物环磷酰胺对照组 29.3%,且比较差异有高度显著性($P < 0.01$)。

2.2 小鼠睾丸染色体畸变试验 见表 2,给小鼠灵芝液的各剂量组的染色体畸变率、畸变细胞率、常染色体单价体和性染色体单价体虽均低于阳性物丝

表 1 灵芝水提取液对环磷酰胺诱发的小鼠骨髓细胞微核的影响

剂量 mL/kg BW	动物数	观察细胞数	微核数	微核率 ‰
3.3	10	10000	230	23.1 ⁽¹⁾
10.0	10	10000	189	18.9 ⁽¹⁾
30.0	10	10000	168	16.8 ⁽¹⁾
阳性对照	10	10000	293	29.3

注:(1) 泊松分布统计 $P < 0.01$ (与阳性对照组比较)。

表 2 灵芝水提取液对丝裂霉素诱发的
小鼠睾丸细胞染色体畸变的影响 ‰

剂量 mL/kg BW	观察动物数	观察细胞数	单价体 性分	染色体畸变 常分	畸变 断片	畸变 易位	畸变 细胞率
3.3	10	500	5.8	3.4	2.8	0	2.8
10.0	10	500	5.2	3.0	2.4	0	2.4
30.0	10	500	6.2	2.8	2.0	0	2.0
丝裂霉素	10	500	7.0	4.4	3.8	0.2	4.0

表 3 灵芝水提取液对体外哺乳类动物细胞
(V79/HGPRT) 基因突变的影响

剂量 mL/L	突变集落数 接种 1×10^6 细胞	存活率 %	突变率 个/ 10^6 存活细胞	抑制率 %
50	66	42.8	154.2 ⁽¹⁾	41.2
10	79	48.0	164.6 ⁽¹⁾	37.2
1	112	50.1	224.0	14.3
阳性对照	162	62.0	261.3	—
阴性对照	1	82.1	1.2	—

注:(1) 泊松分布统计 $P < 0.01$ (与阳性对照组比较)。

裂霉素组,但差异无显著性($P > 0.05$)。

2.3 体外哺乳类动物细胞(V79/HGPRT) 基因突变试验 见表 2,中、高剂量组的基因突变率均低于阳性对照组($P < 0.01$),低剂量组的基因突变率虽低于阳性组,但无统计学意义。

3 讨论

微核是染色体和染色质受损后的染色体片段,其频率可反映细胞 DNA 受损的程度,而 DNA 损伤是组织癌变的机制之一,因此微核被认为是反映机体接触致突变物和致癌物的遗传毒性的敏感指标之一。同时也是公认的筛选抗突变剂的经典方法。本次研究,当灵芝水提取液剂量为 3.3、10.0、30.0 mL/kg BW 时,对环磷酰胺诱导的小鼠骨髓细胞微核有明显抑制作用($P < 0.01$),说明该灵芝水提取液对致突变剂诱导的小鼠体细胞突变有拮抗作用。体外试验也证明,该灵芝水提取液对 MMC 诱导的中国仓鼠肺 V79 细胞基因突变有抑制作用,高、中剂量组均有显著性($P < 0.01$),进一步证实灵芝水提取液对化学物诱导的 DNA 损伤的保护作用。灵芝是一种珍贵的中草药,含有多种有效成分,如,多种氨基酸、多糖和锌、硒、钼等多种人体必需微量元素。研究报道,灵芝对肿瘤有一定的预防作用,可调节机体免疫,增强机体耐力。^[2,3] 其抗肿瘤的有效成分主要是一种灵芝多糖(β-葡聚糖),其预防肿瘤的机制,一方面与其增强机体免疫力有关,另一方面可能是灵芝促进了机体肝脏对致突变物与致癌物的解毒从而保护机体 DNA 免受损伤而起到预防肿瘤作用,我们的研究结果也证明灵芝对机体 DNA 损伤的保护作用。大量研究已证明灵芝有多种保健功能,但由于灵芝成分复杂多样,在利用灵芝的保健功能上仍有许多研究和开发之处,尚有待进一步研究。

参考文献:

[1] 韩玉福. 灵芝的研究进展[J]. 中药材,1995,5:42—43.
[2] 鲁进宇. 灵芝多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国药理学杂志,1995,1:10
[3] 王冠福. 灵芝胶囊对小鼠特异性抗体与肿瘤坏死因子和产生以及抗 S—180 肉瘤的作用[J]. 上海免疫学杂志,1995,3:30
[4] 何来英、戴寅、蔡有余,等. 灵芝水提取液对小鼠免疫功能的影响及其毒性[J]. 中国食品卫生杂志,1997,9(4): 21.
[5] 何来英、戴寅. 灵芝的抗突变作用[J]. 中国食品卫生杂志,1994,6(2):1.

Study on antimutagenic effect of the aqueous extract of ganoderma lucidum/Cui Wenming, Liu Zeqing, Wang Wei, et al. //Chinese Journal of Food Hygiene. - 2002, 14(5): 11 ~ 13.

Abstract: The antimutagenic effect of the aqueous extract ganoderma lucidum (AEGL) were studied. The mice micronucleus test of bone marrow cell, the chromosome aberration test in mice testicle cells and the in vitro mammalian cell gene mutation test had been done. The results showed that the micronuclei frequency induced by cyclophosphamidum in mice bone marrow cell and gene forward mutation rates induced by mitomycin in V79 cell were both inhibited significantly by the AEGL, but it had no effect on the chromosome aberration induced by cyclophosphamidum in mice testis cell. It indicated that the AEGL had preventive effects on DNA damage in body cell.

Author's address: Cui Wenming, National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, PRC.

Key Words: GANODERMA LUCIDUM; Micronuclei; Chromosomes; Genes; Suppression, Genetic

[收稿日期: 2002 - 05 - 09]

卫生部文件
卫法监发[2002]69号

卫生部关于撤销“聚安康粉”
(原名:聚安康)保健食品批准证书的通知

北京泰德利甲壳质科技发展有限公司:

根据群众举报,北京市卫生监督所对你公司生产的“聚安康粉”(产品标识为“聚安康”或“威而浪胶囊”)进行抽检,经卫生部食品卫生监督检验所检验证明该产品中含有枸橼酸西地那非。

我部根据《保健食品管理办法》第二十七条的规定,对你公司生产的“聚安康粉”进行了重新审查。经审查,确认“聚安康粉”中含有枸橼酸西地那非。

枸橼酸西地那非是治疗男性性功能障碍的处方药,禁止加入食品。我认为,你公司的行为违反了《中华人民共和国食品卫生法》第九条、《保健食品管理办法》第四条的规定,现依据《保健食品管理办法》第二十七条的规定,决定撤销你公司“聚安康粉(原名:聚安康)”的保健食品批准证书(批准文号:卫食健字(1998)第462号)。

如不服本决定,可以依据有关法律提起行政复议或行政诉讼。

中华人民共和国卫生部
二〇〇二年三月十五日