

台灣金線連和闊葉大豆(金門產一條根) 之初步基因毒性試驗

吳禮字¹ 吳岳文² 施純青³ 柯裕仁³ 林文川²

中國醫藥學院¹ 微免學科；²藥理學科；³中國藥學研究所

台中

(2001 年 4 月 10 日受理，2001 年 5 月 21 日收校訂稿，2001 年 6 月 5 日接受刊載)

本實驗以 Ames 測試和鯉鼠骨髓細胞微核測試進行台灣金線連及闊葉大豆(金門產一條根)水粗萃取物致突變作用。兩個實驗的結果顯示台灣金線連及闊葉大豆水粗萃取物沒有基因毒性。

關鍵詞：台灣金線連，闊葉大豆，Ames 測試，微核測試，基因毒性。

前 言

臺灣金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hayata) 為蘭科 (Orchidaceae) 金線連屬 (*Anoectochilus* Blume) 多年生草本植物。是臺灣極為名貴之民間藥材，目前野生臺灣金線連採收不易，市場上的臺灣金線連大都為人工栽培。臺灣金線連栽種已形成一個小產業。

「一條根」在金門是歷代流傳的藥用植物。近年來，金門發展觀光業，金門業者以「一條根」原植物或製成茶包及其它產品販賣，幾年下來金門「一條根」的產業有很好的發展。金門地區市面上銷售的「一條根」有多種，金門縣農試所輔導農民栽種的「一條根」，經確認是屬於豆科植物的闊葉大豆 (*Glycine tomentella* Hayata)¹。

為確保使用者的安全，本研究已先後完成臺灣金線連水粗萃取物的急性毒性試驗²、90 日連續餵食毒性試驗²、生殖毒性試驗³，及闊葉大豆水粗萃取物的急性毒性試驗⁴、28 日連續餵食毒性試驗⁴。為進一步瞭解臺灣金線連和闊葉大豆是否有潛在性危害的問題，即是否引起突變具有致癌或遺傳的影響，本研究使用沙門菌回復突變測試法及鯉鼠骨髓細胞之微核測試法來評估這二味藥材的基因毒性。

材料與方法

一、藥材製備

台灣金線連水粗萃取物 (AFE)：所使用之台灣金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hayata) 約一年生，於 1999 年八月間購自埔里蓮園栽培場，並經本校中國藥學研究所生藥學組鑑定，標本也存放於該所。鮮品每 10 公斤加 200 公升的水煎煮四小時，二次，煎煮液過濾後，在 60°C 下經減壓濃縮至濃度 285 mg/ml，而後存放於 -20°C 備用。煎煮濃縮委由世華天然食品股份有限公司辦理，抽出率為 3 %。

闊葉大豆水粗萃取物 (GTE)：所使用之闊葉大豆 (*Glycine tomentella* Hayata) 約三年生，於 2000 年 1 月間購自金門浯記一條根商行，並經本校中國藥學研究所生藥學組鑑定，標本也存放於該所。闊葉大豆乾品粉碎後每 10 公斤加 400 公升的水煎煮四小時，煎煮液過濾後，在 60°C 下經減壓濃縮至濃度 332 mg/ml，而後存放於 -20°C 備用。煎煮濃縮委由世華天然食品股份有限公司辦理，抽出率為 12.5 %。

二、微生物基因突變試驗

依照 Maron 及 Ames 進行沙門菌回復突變試驗即 Ames test⁵，使用菌系為 TA98、TA100、TA102、TA1537、TA1538，由農業藥物試驗所提供。測試方法採平板混合測試 (plate incorporation assay) 經活化處理，另加 0.5 ml S9 混合液，S9 依照 Ames 氏等人的方法⁶，使用 Aroclor 1254 處理的 Wistar 雄性大鼠肝臟製備。

測試藥物使用三種濃度，各濃度重複三次，空白對照使用溶劑，正反應對照使用的藥物為 1 µg/plates 之 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO) 及 10 µg/plates 之 2-aminofluorene (2AF)。將所有培養皿放置 37 °C 定溫箱培養 48 小時後計算回復突變數。

測試結果正反應的判定條件為顯著高於 TA98、TA100、TA102 之自然回復突變 2 倍以上，高於 TA1537、TA1538 之自然回復突變 3 倍以上⁷。

三、鼯鼠骨髓細胞微核試驗

使用 ICR 雄性鼯鼠，體重 25~30 g，每組 5 隻。分別經口投與試驗藥物 2、5、10 g/kg 或飲水 (0.35 ml/10 g) 陽性對照藥物使用 Cyclophosphamide (75 mg/kg, i.p.)，給藥後 24 小時，以頸椎脫臼將鼯鼠犧牲。高劑量組 (10 g/kg) 另進行於投藥後 48、72 小時將鼯鼠犧牲。鼯鼠犧牲後取出雙側股骨，用注射針筒吸取少量小牛血清，將骨髓腔中骨髓沖入小離心試管中，混勻後以 1000 rpm 離心 7 分鐘，吸取上清液，用滴管吹勻沉澱物，吸一滴混懸液滴於載玻片一端，用載片推片，置空氣中晾乾後，以 Giemsa 磷酸緩衝液染色。而後在油鏡下，每隻動物計數多染性紅血球 (polychromatic erythrocytes) 1000 個，記錄微核 (micronucleus) 發生的數目。同時計鼠正紅細胞 (normochromatic erythrocytes) 數目，算出多染性紅血球與正紅細胞^{8,9}。本實驗所得之數據，以單尾變異數分析 (one-way analysis of variance)，並進行 Dunnet 測試，以 P 值小於 0.05 認為有顯著差異。

結果與討論

沙門菌回復突變測試法是 Ames 氏等人所發展出來，此方法利用一系列具有組氨酸需求性之沙門突變菌系，受致變物質刺激時，由需要組氨酸之營養缺乏型回復突變為能自行合成組氨酸之野生型的特性，藉缺乏組氨酸之選擇培養基檢定，以測知化合物之突變性⁵。

本試驗所使用的菌種為 TA98、TA100、TA102、TA1537、TA1538，事先皆經組氨酸需求性的確認。預試驗時不加 S9，AFE 及 GTE 都沒有突變性，正式實驗時加 S9 進行。S9 是由大鼠肝臟製備而得的代謝活化系統，許多致突變劑需經體內代謝活化才能顯出致突變作用，這種代謝活化有賴於細胞內微粒體混合功能氧化酵素系，細菌體內無此酵素系，因此須外加此酵素系（S9 混合物），以提高沙門菌回復突變檢出率⁵。

加 S9 實驗重複三次，所得結果如表 1 所示。陽性對照藥物 4-nitroquinoline-N-oxide (1 µg/plate)、2-aminofluorene (10 µg/plate) 溶於 DMSO，對 5 種菌種所致的突變數皆遠高於自然突變數 2 或 3 倍以上。AFE (15 – 60 mg/plate) 對 5 種菌種的回復突變菌落數均在正常範圍，即回復突變菌落數小於自然回復突變數 2 倍以內。GTE 在濃度 15, 30 mg/plate 對 5 種菌種的回復突變菌落數均在正常範圍。GTE 60 mg/plate 對 TA98 和 TA100 所致突變數高於自然回復突變數 2 倍以上，但對 TA102、TA1537 和 TA1538 所致回復突變數在正常範圍內。

依照衛生署公告的健康食品安全性評估方法，最高劑量為 5 mg/plate，在本試驗所使用的劑量為 5 mg/plate 的 3 至 12 倍。這些實驗結果明確顯示 AFE 和 GTE 對沙門菌回復突變測試為陰性反應。雖然 GTE 在最高劑量對 TA98 和 TA100 兩種菌種呈弱突變能力，但對其餘 3 種菌種為陰性反應。

若藥物對染色體造成損傷，喪失著絲點的染色體斷片，到末期時被子細胞排除，游離於細胞質中，即形成微核。骨髓中多染性紅血球數量多，微核容易辨認且自發率低，因此常被用來檢測受試藥物誘變活性的方法^{8,9}。

Table 1. Ames test results of AFE and GTE.

Drug and Dose		TA 98 + S9	TA100 + S9	TA102 + S9	TA1537 + S9	TA1538 + S9
H ₂ O	100 µl/plate	25 ± 6	52 ± 8	69 ± 15	30 ± 10	50 ± 8
AFE	15 mg/plate	7 ± 6	12 ± 7	3 ± 1	16 ± 2	7 ± 2
	30 mg/plate	4 ± 5	9 ± 15	3 ± 1	26 ± 9	17 ± 5
	60 mg/plate	11 ± 4	8 ± 6	2 ± 2	58 ± 5	9 ± 2
GTE	15 mg/plate	7 ± 3	25 ± 8	2 ± 1	20 ± 2	6 ± 2
	30 mg/plate	55 ± 7	67 ± 15	3 ± 1	35 ± 9	15 ± 5
	60 mg/plate	107 ± 12	154 ± 21	50 ± 20	89 ± 32	45 ± 13
DMSO	20 µl/plate	8 ± 3	15 ± 3	5 ± 3	2 ± 1	10 ± 1
NQNO	1 µg/plate	213 ± 23	417 ± 56	850 ± 79	232 ± 65	450 ± 78
AF	10 µg/plate	475 ± 50	1428 ± 205	530 ± 78	465 ± 45	1350 ± 234

All values are means ± S.D. (n=3). NQNO: 4-nitroquinoline-N-oxide, AF:2-aminofluorene

Table 2. The frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (PCE) in bone marrow cells in mice, induced by AFE, GTE and cyclophosphamide (CP).

Treatment	No. of mice used	No. of PCE Scored	% of MN in PCE	PCE/NCE ratio
Control	5	5018	0.64 ± 0.04	0.77 ± 0.06
AFE 2 g/kg ¹	5	5016	0.64 ± 0.09	0.78 ± 0.07
5 g/kg ¹	5	4912	0.55 ± 0.03	0.71 ± 0.07
10 g/kg ¹	5	4063	0.69 ± 0.07	0.72 ± 0.08
AFE 10 g/kg ²	5	5072	0.74 ± 0.06	0.64 ± 0.10
AFE 10 g/kg ³	5	4914	0.67 ± 0.16	0.74 ± 0.07
GTE 2 g/kg ¹	5	5050	0.76 ± 0.05	0.62 ± 0.06
5 g/kg ¹	5	5199	0.87 ± 0.12	0.67 ± 0.09
10 g/kg ¹	5	4870	0.96 ± 0.25	0.78 ± 0.12
GTE 10 g/kg ²	5	5120	0.70 ± 0.16	0.68 ± 0.13
GTE 10 g/kg ³	5	5050	0.63 ± 0.07	0.66 ± 0.07
CP 75 mg/kg ¹	5	5394	3.10 ± 0.30***	0.36 ± 0.04***

All values are means ± S.E. ***P<0.01 compared with control group.

¹: The mice were sacrificed 24 hr after AFE, GT or CP administration.

²: The mice were sacrificed 48 hr after AFE or GT administration.

³: The mice were sacrificed 72 hr after AFE or GT administration.

MN: micronucleus; NCE: normochromatic erythrocytes

我們先前的實驗顯示 AFE 和 GTE 的大鼠急性毒性試驗，一半致死劑量兩者均大於 10 g/kg。因此在本試驗最高使用劑量為 10 g/kg。為觀察微核出現的時間分布，除了在給藥後 24 小時將鼯鼠犧牲外，高劑量組另進行給藥後 48、72 小時犧牲的試驗。

由表 2 所示，鼯鼠口服投予 AFE (2, 5, 10 g/kg) 或 GTE (2, 5, 10 g/kg) 24 小時後犧牲，其骨髓多染性紅血球與正紅細胞比值與控制組之間無顯著差異，顯示其對骨髓細胞沒有毒性、微核率與控制組之間也沒有差異，此說明 AFE 和 GTE 的微核試驗結果為陰性。AFE 和 GTE 高劑量 (10 g/kg) 投予後 48、72 小時後將鼯鼠犧牲，也顯示 AFE 和 GTE 的微核試驗結果為陰性。正對照藥物 Cyclophosphamide (75 mg/kg, i. p.) 投予後 24 小時明顯出現骨髓多染性紅血球與正紅細胞比值下降(P < 0.001), 微核率增加(P < 0.001), 說明了其具骨髓抑制作用及對染色體損傷作用。

結論：台灣金線連和闊葉大豆，進行沙門菌回復突變及鼯鼠骨髓細胞微核試驗，結果顯示此二味藥材水粗萃取物沒有致突變作用。

誌 謝

本研究蒙國科會 (NSC89-2317-B039-002)、經濟部工業局 (4RY-C-B089-31)、金門浯記一條根商行贊助經費，特此誌謝。農委會農業藥物毒物試驗所應用毒理系游碧堉研究員提供微生物試驗菌種，及指導鼯鼠骨髓微核試驗顯微觀察，謹此表示由衷感謝。

參考資料

1. 柯裕仁、謝文全、邱年永、陳忠川，市售一條根類藥材之藥用植物考察，中國醫藥學院雜誌，8:33-46, 1999。
2. 林文川、施純青、吳岳文、陳臆如、張惠玲、許朝添，台灣金線連水粗萃取物對大鼠 90 天餵食毒性作用，中醫藥雜誌，11:19-29, 2000。
3. 林文川、施純青、吳岳文，妊娠期及授乳期母鼠投與台灣金線連水粗萃取物對新生兒的影響，中醫藥雜誌，11:79-86, 2000。
4. 林文川、柯裕仁、吳岳文，闊葉大豆（金門產一條根）水粗萃取物對大鼠 28 天餵食毒性作用，中醫藥雜誌，11:205-216, 2000。
5. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res. 113:173-215, 1980.
6. Ames BN, McCann J, Yamasaki, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella test. Mutat. Res. 31:347-363. 1975.
7. 臺灣省農業藥物毒物試驗所應用毒理系，化學物質遺傳毒性之簡易偵測法 1.沙門菌回復突變測試法，應用毒理系技術專刊，1:1-11, 1987。
8. Schmid W. The micronucleus test. Mutat. Res. 31:9-15, 1975.
9. Garcia M, Alarcon M, Duk S, Weigert, G. Induction of micronuclei in mice bone marrow cells by home made aguardientes collected in southern chile and their incidence in gastric cancer. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 49:866-870.

J Chin Med 12(3): 173-178, 2001

PRIMARY STUDIES ON THE GENOTOXICITY OF AQUEOUS EXTRACTS FROM *ANOECTOCHILUS FORMOSANUS* AND *GLYCINE* *TOMENTELLA*

Lii-Tzu Wu¹, Yueh-Wern Wu², Chun-Ching Shih³, Yu-Jen Ko³
and Wen-Chuan Lin²

¹Department of Microbiology, ²Department of Pharmacology,
³Chinese Pharmaceutical Science, China Medical College,
Taichung, Taiwan

(Received 10th April 2001, revised Ms received 21th May 2001, accepted 5th June 2001)

The aqueous extracts of *Anoectochilus formosanus* (AFE) and *Glycine tomentella* (GTE) were tested for mutagenicity in the Ames test and micronucleus test in bone marrow cells of mice. The results of two experiments indicated that both AFE and GTE had no genotoxicity.

Key words: *Anoectochilus formosanus*, *Glycine tomentella*, Ames test, Micronucleus test, Genotoxicity.