

盐藻 β -胡萝卜素抗突变效应¹

R-977 R977-21

马国建², 薛开先³, 吴建中 (江苏省肿瘤防治研究所, 南京 210009, 中国);
袁生³, 秦怀兰 (南京师范大学生物系, 南京 210097, 中国)

Antimutagenic effects of β -carotene from *Dunaliella salina*¹

MA Guo-Jian², XUE Kai-Xian, WU Jian-Zhong (Jiangsu Institute of Cancer Research, Nanjing 210009, China); YUAN Sheng, QIN Huai-Lan (Department of Biology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

KEY WORDS beta carotene; *Dunaliella salina*; mutagenicity tests; micronucleus tests; chromosome aberrations; lymphocytes; mitomycin C

AIM: To study the genotoxic and antimutagenic effects of β -carotene from *Dunaliella salina* (β -CDS). **METHODS:** The *in vitro* micronucleus and chromosomal aberration tests in human lymphocytes were adopted. The effect of β -CDS on mutagenesis induced by γ -rays and mitomycin (Mit) was studied. **RESULTS:** β -CDS ($1-30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) had no genotoxicity, but inhibited spontaneous and γ -ray-induced micronucleus formation and Mit-induced chromosomal aberrations in human lymphocytes *in vitro*. The genotoxic action of synthetic β -carotene (S β C) was suppressed, the antimutagenic effects were heightened when S β C and β -carotene oil (β CO, one of the β -CDS compositions) were mixed in proportion as 80:27.5. **CONCLUSION:** β -CDS is an antimutagenic agent.

关键词 β -胡萝卜素; 杜氏盐藻; 诱变性试验; 微核试验; 染色体畸变; 淋巴细胞; 丝裂霉素 C

目的: 研究盐藻 β -胡萝卜素 (β -carotene from *Dunaliella salina*, β -CDS) 致突变及抗突变作用。 **方法:** 用体外人淋巴细胞微核和染色体畸变检测, 研究了 β -CDS 对 γ -射线和丝裂霉素 (Mit) 诱变作用的

影响。 **结果:** β -CDS $1-30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对人淋巴细胞无致突变性, 但能抑制 γ -射线诱发的微核形成和 Mit 诱发的染色体畸变。 当合成 β -胡萝卜素与天然 β -胡萝卜素油 (β -CDS 成份之一) 按 80:27.5 混合后, 拮抗了前者的遗传毒性, 并使两者的抗突变作用得到增强。 **结论:** β -CDS 是一种抗突变成份。

盐藻 β -胡萝卜素 (β -carotene from *Dunaliella salina*, β -CDS) 是从杜氏盐藻 (*Dunaliella salina*) 中提取出的天然 β -胡萝卜素成份, 可增强小鼠免疫功能, 提高抗氧化和抑瘤能力^[1-3]。 有关 β -胡萝卜素 (β C) 防治人类肿瘤的研究受到关注^[4,5], 因此进一步研究 β -CDS 抗突变效应, 对于肿瘤的化学防治, 有应用价值。 本文研究 β -CDS 各组份及合成 β C 的致突变和抗突变效应。

MATERIALS AND METHODS

β C 制剂 β C 共 4 个组份: 合成 β C (synthetic β -carotene, S β C, 上海化试商店, 批号 930103); 其它 3 个组份均由南京师范大学生物系研制, 1) 盐藻中提取纯化的 β C 晶体 (β -carotene crystal, β CC); 2) 盐藻中提取的 β C 油 (β -carotene oil, β CO); 3) S β C 与 β CO 按 80:27.5 混合而成的 β C (β -carotene mixture, β CM)。

静脉血采自健康供血员 8 人, 4 M, 4 F, 年龄 20 ± 2 a, 新采血样立即用培养小瓶 0.4 mL/瓶分装。 实验用 β C 先以 15% Me_2SO (RPMI-1640 溶解), 再用 RPMI-1640 稀释成各种浓度, 诱变剂丝裂霉素 (Mit, 日本协和发酵工业株式会社) 亦用 RPMI-1640 稀释。

采用人淋巴细胞染色体畸变和微核测试方法, 比较分析了 β -CDS 各组份及合成 β C 的抗突变效应, 并对其致突变作用也做了评估。

体外人淋巴细胞微核实验 实验分 8 组。 阴性对照 I 组加 15% Me_2SO 0.1 mL, β C 处理 3 组, 加 0.1 mL, 终浓度分别为 1, 6, $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 S β C, β CC 和 β CO。 阳性对照 I 组及抗突变 3 组经 γ -线照射, 抗突变组立即加入剂量同上的 3 种 β C 0.1 mL, 各组总量 0.5 mL, 于 37°C 放置 16-18 小时, 制备淋巴细胞微核制片^[6]。 经 Giemsa 染色, 制片

¹ Project supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No DJ93102.

² Correspondence to Mr MA Guo-Jian, technician-in-charge. Phn 86-25-335-9523.

Received 1997-02-17

Accepted 1997-10-17

编号, 油镜下观察微核, 核变形, 核碎裂等核损伤指标. 本文仅分析微核率(MNF%)的变化, 每1000个淋巴细胞为1个观察组, 每个剂量共计观察15组.

培养人淋巴细胞染色体畸变检测 经微核实验筛选后, 选择 β CO并另加 β CM做染色体畸变检测. 按常规作微量全血培养. 阳性对照为Mit $0.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, β C剂量及实验分组同上. 培养物 37°C 培养24小时后, 分别加入 β CO和 β CM. 抗突变组及时加入Mit, 继续培养至72小时, 于收获细胞前2小时加入秋水仙素, 常规制备染色体片. 染色, 制片编号, 镜下分析分散良好的中期分裂象, 记录染色体和染色单体的各种畸变.

统计分析 微核实验各组间MNF的差异用U检验, 染色体畸变检测的组间畸变细胞率(ACF)差异, 采用 χ^2 检验.

RESULTS

S β C, β CC和 β CO对 γ -线诱发人淋巴细胞微核的影响 经 β C $1-30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理后, 盐藻中提取的 β CC, β CO对人淋巴细胞微核形成无影响, 并且 β CO $1, 6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组与对照组比, MNF呈下降趋势, 且在 $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 实验组有显著差异($P < 0.05$), 表明 β CO可抑制人淋巴细胞的自发性遗传损伤; S β C在实验剂量内($1-30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)可显著诱发人淋巴细胞微核增加, 提示有致突变作用. 但3种 β C对 γ -线诱发的微核增加均有极显著抑制作用($P < 0.01$), 其中以 β CO对 γ -线防护作用最为显著, 致使 γ -线+ β CO各组MNF下降至阴性对照组水平(Tab 1).

β CO及 β CM对Mit诱发人淋巴细胞染色体畸变的影响 β CO, β CM $1-30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量均不引起人培养淋巴细胞染色体ACF的明显增加($P > 0.05$), 经Mit诱发后, ACF显著增加, 当Mit与 β CO或 β CM联合处理后, 各抗突变组ACF呈 β C剂量依赖性下降. 与Mit组比较, 差异极显著($P < 0.01$); β CM各剂量组抑制Mit诱变作用均优于 β CO各组, 而且在1和 $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量组, 两者出现极显著差异($P < 0.01$, Tab 2).

DISCUSSION

利用化学药品和其它天然成份干预理化因子对机体细胞的致癌、致突变作用^[4,7]是目前肿瘤防治的重要措施之一, 近年来肿瘤化学防护的临床及实验研究表明: β C对致癌因子诱发的多种动物以及人类某些肿瘤有明显的防护效果^[5,8]. 本实验结果 β -CDS ($1-30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)对人淋巴细胞无遗

Tab 1. Influence of S β C, β CC, and β CO on micronucleus formation induced by γ -rays in human lymphocytes *in vitro*. $n = 15$ (1000 lymphocytes each), $\bar{x} \pm s$. ^a $P > 0.05$, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ vs control; ^f $P < 0.01$ vs γ -rays.

Group/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Micronucleus formation/%
Negation control	0.05 ± 0.07
Synthetic β C	0.10 ± 0.05^b
6	0.18 ± 0.15^c
30	0.20 ± 0.10^c
β C crystal	0.05 ± 0.08^a
6	0.02 ± 0.04^a
30	0.05 ± 0.06^a
β C oil	0.02 ± 0.04^a
6	0.01 ± 0.03^a
30	0.08 ± 0.12^a
Positive control	0.40 ± 0.10
γ -rays +	0.15 ± 0.09^f
Synthetic β C	0.13 ± 0.07^f
6	0.23 ± 0.15^f
30	0.23 ± 0.15^f
γ -rays +	0.18 ± 0.08^f
β C crystal	0.14 ± 0.05^f
6	0.12 ± 0.08^f
30	0.12 ± 0.08^f
γ -rays +	0.06 ± 0.08^{af}
β C oil	0.04 ± 0.05^{af}
6	0.04 ± 0.05^{af}
30	0.04 ± 0.05^{af}

Tab 2. Effects of β -carotene oil and mixture on chromosomal aberration induced by mitomycin in human cultured lymphocytes. b/f: breakage/fragment, g: gap, t: triradial, q: quadriradial, r: ring. ^a $P > 0.05$ vs control. ^f $P < 0.01$ vs Mit, ¹ $P < 0.01$ vs Mit + β CO $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ group. ¹ $P < 0.01$ vs Mit + β CO $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ group.

Group	$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Donors	Scored cells	Aberration cells	Aberration cells	ACF %
Control	-	5	500	14	b/f, gq	2.8
Mit	0.12	5	375	115	b/f, gqtr	30.7
β CO	1	5	500	13	b/f, g	2.6 ^a
6	5	500	13	b/f, g	2.6 ^a	
30	5	500	17	b/f, g	3.4 ^a	
β CM	1	3	300	7	b/f, g	3.4 ^a
6	3	300	8	b/f, g	2.7 ^a	
30	3	300	9	b/f, g	3.0 ^a	
Mit + β CO	1	5	415	90	b/f, gtq	21.7 ^f
6	5	425	65	b/f, gq	15.3 ^f	
30	5	414	36	b/f, gq	8.7 ^f	
Mit + β CM	1	3	300	33	b/f, gt	11.0 ^a
6	3	300	25	b/f, gtq	8.3 ^d	
30	3	300	17	b/f, g	5.7 ^f	

传毒性, 并且 β CO还可抑制人体细胞的自发性遗传损伤. 在研究中采用的 γ -线和Mit为常用肿瘤

治疗, 但均为有直接致癌作用的诱变因子^[9], 可分别引起人淋巴细胞 MNF 和 ACF 的显著增加. 本研究联合使用 β -CDS 各组份后, 各抗突变实验组 MNF 和 ACF 均呈明显下降. 微核实验组中 β CO 各抗突变组接近阴性对照水平, 在最低剂量组 ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) β -CDS 各组份即显示出抑制 γ -线和 Mit 诱变的作用. 结合前期实验结果^[1-3]分析, 可进一步证实 β -CDS 可减少致癌、致突变因子对 DNA 蛋白质等重要生物大分子的损伤, 调整和激发机体免疫功能, 从而预防并可降低诱变因子的致癌或毒副作用, 这和文献报告的类似实验结果^[10,11]相一致. 目前大多数肿瘤治疗药物及射线等, 均对人体有毒副作用, 不仅限制了其临床疗效, 还存在一定的致突变作用, 对人体有继发二次肿瘤的危险^[12]. 本研究结果表明: β -CDS 是一种抗突变物质, 对人体无遗传毒性, 有望减轻肿瘤放、化疗毒副反应和预防药物治疗性二次肿瘤的发生. 但这还需要临床实验做进一步验证.

在染色体畸变分析中我们发现: 当 S β C 与 β CO 按一定比例混合后使用, 不仅拮抗了 S β C 对体外人淋巴细胞的致突变作用, 而且还增强了两者的抗突变效果. 由于 S β C 系人工合成, 工艺成熟并且价格低廉, 这一实验发现, 将可能为利用 β C 资源和开发其药用制剂提供有价值的资料.

REFERENCES

- 1 Yuan S, Qin HL, Dai CC, Dai YJ, Liu ZL, Ding BY, *et al.* Extraction and identification of natural β -carotene crystal and natural β -carotene oil from *Dunaliella salina*. *Pharm Biotech* 1996; 3: 34-9.
- 2 Wu XD, Cheng YY, Luo J, Ding CL, Jing AN, Ding BY, *et al.* Up-regulation of natural β -carotene crystal on mice immune function. *J Nanjing Normal Univ (Natural Sci)* 1997; 20: 61-4.
- 3 Zhu QL, Ding BY, Qin SL, Yuan S. Effect of β -carotene on GSH-PX activity in planted-tumor mice blood. *Chin J Biochem Pharm* 1996; 17: 159-61.
- 4 Omenn GS, Goodman G, Grizzle J, Thornquist M, Rosenstock L, Barnhart S, *et al.* CARET. The beta-carotene and retinal efficacy trial to prevent lung cancer in asbestos-exposed workers and smokers. *Anticancer Drugs* 1991; 2: 79-86.
- 5 Greenwald P, Kelloff G, Burch-Whitman C, Kramer BS. Chemoprevention. *CA* 1995; 45: 31-49.
- 6 Xue KX, Ma CJ, Wang S, Wang YP. Nuclear anomaly test in human lymphocytes *in vitro*. *Acta Pharmacol Sin* 1992; 13: 464-7.
- 7 Bianchi L, Melli R, Pizzala R, Stivala LA, Rehak L, Quarta S, *et al.* Effects of β -carotene and α -tocopherol on photogenotoxicity induced by 8-methoxypsoralen: the role of oxygen. *Mutat Res* 1996; 369: 183-94.
- 8 Kelloff GJ, Boone CW, Malone WP, Steele VE. Chemoprevention clinical trials. *Mutat Res* 1992; 267: 291-5.
- 9 Kuo ML, Lee KC, Lin JK. Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by apigenin tannic acid, ellagic acid and indole-3-carbinol in the *Salmonella* and CHO systems. *Mutat Res* 1992; 270: 87-95.
- 10 Lü HZ, Geng BQ, Zhu YL, Yong DG. Effects of β -carotene on doxo-rubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Acta Pharmacol Sin* 1996; 17: 317-20.
- 11 Gebhart E. Anticlastogenicity in cultured mammalian cells. *Mutat Res* 1992; 267: 211-20.
- 12 Rowley JD, Le Beau MM. Treatment-related acute myeloid leukemia new insights in leukemogenesis. *Mutat Res* 1991; 252: 167.

Announcement

Prior and duplicate publications are not allowed. All manuscripts, especially the data, must not be published or submitted for publication elsewhere, irrespective of whether the wording is the same. The authors should make a full statement to the *Acta Pharmacologica Sinica* (APS) about all submissions and previous reports that might be regarded as prior or duplicate publication of the same or very similar work. Copies of such material should be included with the manuscript to the APS. (See Information for authors of APS 1998 Jan; 19 (1); I - VII)

本刊对已发表或重复发表的论文是不接受的. 所有来稿, 不论文字(种)表述是否相同, 尤其是主要数据, 应没有发表或投寄于他处.