

Antagonistic Effect of Propolis on Mutation Induced by Thiotepa, Adriacin and Acridine Orange

蜂胶乙醇提取物基因抗突变作用的研究

WANG Ju-xiang¹, PEI Shi-geng², MEN Jin-e³, et al
(1. Department of Hygien, Hebei Engineering College, Handan 056029, China; 2. Department of oto Laryngology, the Affiliated Hospital of Hebei Engineering College, Handan 056000, China; 3. Experimental Center of the Medical Faculty, Hebei Engineering College, Handan 056000, China)

王菊香¹/裴士庚²/门金娥³/田珂³/
郑海萍³/王延臣²/段晓辉²
(1. 河北工程学院卫生教研室, 河北 邯郸 056029; 2. 河北工程学院附属医院耳鼻喉科, 河北 邯郸 056000; 3. 河北工程学院医学部中心实验室, 河北 邯郸 056000)

【摘要】背景与目的:探讨蜂胶乙醇提取物对噻替哌等诱变剂诱发的基因突变的抑制作用。材料与方法:用 Ames 试验检测蜂胶乙醇提取物的诱变性及对噻替哌、阿霉素、吖啶橙诱发的 TA₉₈ 和 TA₁₀₀ 菌株回复突变后的抑制作用。结果:在 10~1 000 μg/皿蜂胶乙醇提取物对 TA₉₈ 和 TA₁₀₀ 菌株未出现回变菌落数的增高。10~250 μg/皿蜂胶浓度出现中等强度或以下强度抑制(抑制率 < 75 %);1 000 μg/皿蜂胶浓度出现高强度回变菌落数抑制,且对试验所设 3 种诱变剂诱发的基因突变的抑制作用均有剂量-效应关系。结论:蜂胶对噻替哌等诱变剂所诱发的不同类型的基因突变均有不同程度的抑制作用。

【关键词】蜂胶; 诱变剂; Ames 试验; 基因突变

中图分类号: R394.6

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2005)01-0039-02

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: To study the antagonistic effect of propolis on gene-mutation induced by thiotepa and other strong mutagens. MATERIAL AND METHODS: Using Ames-test, the antagonistic effect of propolis to reverse mutation of strains TA₁₀₀ and TA₉₈, which induced by thiotepa, adriacin and acridine orange, were assessed. RESULTS: The propolis inhibited all the mutations induced by the three kind of mutagens and showed dose-effect relationship. Dose of 10~250 μg/plate of propolis could inhibit mutations by the middle intensity or below (restrain rate < 75 %). At dose of 1 000 μg/plate of propolis could strongly inhibit mutations induced by thiotepa, adriacin, and acridine orange. There were no mutant character of the propolis. CONCLUSION: There were antagonistic effect of propolis to gene-mutation induced by different kinds of mutagen, such as adriacin.

【KEY WORDS】 propolis; mutagen; Ames test; gene mutation

蜂胶是蜜蜂从树皮的裂缝和植物的幼芽上采集植物的树脂,加入唾液中的酶和助消化物质以及蜂蜡,经咀嚼调制而成的一种树脂状物质。研究表明,蜂胶中含有多种具有抗菌、抗氧化、抗病毒、调节机体免疫功能及防癌抗癌功效的生物活性物质^[1,2],一些国家作为民间用药有悠久的历史,有文献^[3]报道蜂胶乙醇提取物对环磷酰胺等基因突变具有抑制作用,本文用 Ames 试验检测蜂胶对噻替哌等诱变剂诱发基因突变的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 蜂胶 从邯郸市某养蜂厂采集新鲜蜂胶,冰冻粉碎后以 95 %乙醇浸泡提取 72 h,过滤,滤液于 40 °C减压挥干,二甲基亚砜(DMSO)溶解定容。

1.2 Ames 试验 采用平板掺入法。选用 TA₉₈ 和 TA₁₀₀ 菌株,菌种引自美国 Ames 试验室,经中国药品生物制品检定所鉴定菌种特性符合试验要求。均设加与不加 S₉(由中国药品生物制品检定所提供)两种情况,TA₁₀₀ 菌株用噻替哌作诱变剂,TA₉₈ 不加 S₉ 时用阿霉素作诱

收稿日期: 2004-04-12; 修订日期: 2004-08-29

基金项目: 邯郸市科学技术研究与发展项目(No. 04033)

作者简介: 王菊香(1963-),女,河北省邯郸市人,副教授,研究方向:卫生检验。Tel: 0310-3107382

变剂, TA₉₈加 S₉时用吡啶橙作诱变剂。蜂胶提取物设 4 个浓度组, 将 45 °C 融化表层培养基、菌液、阳性物、各浓度蜂胶提取物、S₉ 混合液在灭菌试管中混匀后平铺到底层培养基上, 37 °C 培养 48 h, 计数回变菌落数并观察菌苔生长情况, 每组设 3 个平行样, 重复两次。诱变试验结果用每皿回变菌落数和 MR 值 (MR = 诱发回变菌落数/自发回变菌落数) 表示, MR ≥ 2 并有剂量 - 效应关系时为诱变阳性。抗诱变试验结果用诱变抑制率表示:

抑制率 = [(阳性物诱发回变菌落数 - 受试物加阳性物诱发回变菌落数)/(阳性物诱发回变菌落数 - 自发回变菌落数)] × 100 %。

抑制率 < 25 % 为无抑制, 抑制率为 25 % ~ 50 % (不包括 50 %) 为弱抑制, 抑制率为 50 % ~ 75 % (不包括 75 %) 为中度抑制, 抑制率 ≥ 75 % 为强抑制^[4]。

1.3 统计分析 采用 SAS 软件对测定结果的剂量 - 效应关系进行直线相关性分析。

2 结果

2.1 蜂胶乙醇提取物致突变试验结果 蜂胶浓度在 10 ~ 1 000 μg/皿范围内未引起突变阳性反应 (MR < 2), 同时也未发现抑菌现象。见表 1。

2.2 蜂胶乙醇提取物抑制诱变试验 当蜂胶浓度为 10 μg/皿时, 对吡啶橙引起的 TA₉₈(+S₉) 菌株回复突变率和噻替哌引起的 TA₁₀₀(-S₉) 菌株回复突变率均无抑制作用; 对阿霉素引起的 TA₉₈(-S₉) 菌株回复突变率表现为弱抑制, 对噻替哌引起的 TA₁₀₀(+S₉) 菌株回复突变率表现为中度抑制。当蜂胶浓度为 50 μg/皿时, 除对噻替哌引起的 TA₁₀₀(+S₉) 菌株回复突变率表现为中度抑制外, 对其余阳性物引起的菌株的回复突变率均表现为弱抑制。当蜂胶浓度为 250 μg/皿时, 对吡啶橙引起的 TA₉₈(+S₉) 菌株的回复突变仍表现为弱抑制, 对其余阳性物引起的菌株的回复突变率均表现为中度抑制。当蜂胶浓度为 1 000 μg/皿时, 4 个试验组均产生强抑制, 最高一组 (噻替哌引起的 TA₁₀₀(+S₉) 组) 抑制率达到 99.78 %。直线相关分析显示, 四个试验组均有剂量 - 效应关系 (相关系数 r_{TA₉₈-S₉} = 0.968 4, r_{TA₉₈+S₉} = 0.971 7, r_{TA₁₀₀-S₉} = 0.966 4, r_{TA₁₀₀+S₉} = 0.965 5, 均为 P < 0.05)。见表 2。

3 讨论

许多植物分泌的树脂类物质具有很好的抗菌、防腐、防水、隔热等作用, 可以保护叶、花、果实、幼芽。蜜蜂

表 1 蜂胶对 TA₉₈ 和 TA₁₀₀ 菌株诱发回变试验结果 (x̄ ± s)

Table 1 Inducing mutation of propolis on strains TA₁₀₀ and TA₉₈

Groups	Concentration μg. plate ⁻¹	TA ₉₈ - S ₉		TA ₉₈ + S ₉		TA ₁₀₀ - S ₉		TA ₁₀₀ + S ₉	
		No. of colong	Rate of mutation (× 10 ⁻²)	No. of colong	Rate of mutation (× 10 ⁻²)	No. of colong	Rate of mutation (× 10 ⁻²)	No. of colong	Rate of mutation (× 10 ⁻²)
Negative	0	29.7 ± 2.7	1.00	27.8 ± 3.1	1.00	-	-	-	-
Propolis	10	34.2 ± 2.1	1.15	40.3 ± 3.4	1.45	121.0 ± 20.3	1.00	160.3 ± 13.2	1.00
	50	36.8 ± 3.9	1.24	34.5 ± 3.3	1.24	157.3 ± 23.3	1.30	161.6 ± 20.7	1.01
	250	46.3 ± 3.0	1.56	32.8 ± 4.2	1.18	121.0 ± 12.2	1.00	130.8 ± 9.1	0.82
	1 000	38.0 ± 5.3	1.28	37.8 ± 4.0	-	200.9 ± 16.9	1.66	111.6 ± 11.3	0.69
Thiotepa	10	-	-	-	-	187.6 ± 17.6	1.55	116.9 ± 14.1	0.73
Adriacin	5	431.0 ± 21.6	14.51	-	-	1 093.5 ± 52.6	9.04	1 040.3 ± 50.1	6.49
Acridine orange	25	-	-	488.5 ± 38.5	1.36	-	-	-	-

表 2 蜂胶抑制 TA₁₀₀ 和 TA₉₈ 诱发回变试验结果 (x̄ ± s)

Table 2 Inhibition of propolis on reverse mutation of strains TA₁₀₀ and TA₉₈

Groups	Concentration μg. plate ⁻¹	TA ₉₈ - S ₉		TA ₉₈ + S ₉		TA ₁₀₀ - S ₉		TA ₁₀₀ + S ₉	
		Adriacin	Rate of suppress (× 10 ⁻²)	Adriacin	Rate of suppress (× 10 ⁻²)	Adriacin	Rate of suppress (× 10 ⁻²)	Adriacin	Rate of suppress (× 10 ⁻²)
Negative	0	29.7 ± 2.7	1.0	27.8 ± 3.1	1.0	121.0 ± 20.3	1.0	160.3 ± 13.2	1.0
Propolis	10	280.9 ± 65.5	37.4	377.9 ± 47.6	24.0	854.3 ± 66.7	24.6	592.9 ± 81.3	50.8
	50	266.8 ± 27.3 *	40.9	306.5 ± 51.3 *	39.5	655.6 ± 61.9 *	44.0	587.3 ± 77.8 *	51.5
	250	199.8 ± 34.6 *	57.6	264.6 ± 39.0 *	48.6	558.6 ± 44.2 *	55.0	386.5 ± 62.2 *	74.3
	1 000	113.9 ± 11.9 *	79.0	102.0 ± 27.0	83.9	164.8 ± 21.9 *	95.5	62.3 ± 22.5 *	99.8
Thiotepa	10	-	-	-	-	1 093.5 ± 52.6	9.0	1 040.3 ± 50.1	6.5
Adriacin	5	431.0 ± 21.6	14.51	-	-	-	-	-	-
Acridine orange	25	-	-	488.5 ± 38.5	17.57	-	-	-	-

Compared with group of different propolis concentration, * P < 0.05.

(下转第 44 页)

化的机率。因此,镉本身存在的弱遗传毒性加上它引起的 DNA 修复系统功能改变可能是镉致癌机制的一个重要方面。

参考文献:

[1] Hartmann A, Speit G. Effect of arsenic and cadmium on the persistence of mutagen-induced DNA lesions in human cells [J]. *Environ Mol Mutagen*, 1996, 27: 98 - 104.

[2] Hartwig A. Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity: a review [J]. *Environ Health Perspect*, 1994, 102(3): 45 - 50.

[3] Fatur T, Lah TT, Filipic M. Cadmium inhibits repair of UV-, methylmethane-sulfonate and N-methyl-N-nitrosourea-induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells [J]. *Mutat Res*, 2003, 529(1-2): 109 - 116.

[4] 蔡永庭, 邹介智, 瞿永华. 简化人全血细胞 DNA 非程序合成检测化学致癌物研究 [J]. *肿瘤*, 1988, 8(2): 77 - 79.

[5] 沈芳兰, 张秀珍, 李珏声, 等. 牛磺酸对小鼠抗氧化和 DNA 修复能力的作用 [J]. *营养学报*, 1996, 18(3): 258 - 261.

[6] Pruski AM, Dixon DR. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L [J]. *Aquat Toxicol*, 2002, 57(3): 127 - 37.

(上接第 40 页)

采集树脂并调制成蜂胶后,用来加固巢、填补蜂巢缝隙与空间、涂抹巢房,还用蜂胶密封已被蜇死而不能清除出巢外的敌害,防止其腐烂。可见蜂胶是一种天然抗菌防腐物质。

国内外大量研究已经从世界各地蜂胶中鉴定出 300 多种化合物,多种微量元素和维生素^[2],对其中的某些化合物单项研究证明,蜂胶中的多种物质具有抗突变抗癌作用^[1,5-7],根据蜂胶具有的多种生物活性组分的特点,本文用 Ames 试验测定了蜂胶的诱变和抗诱变作用,结果显示,蜂胶无致突变作用,能抑制多种诱变剂诱发的不同类型的基因突变,且无论是否经肝微粒体酶活化,对阳性物诱发的突变均有拮抗作用,所以可初步认为,蜂胶具有广谱的抗诱变作用。

由于蜂胶抗突变作用的化学成分非常复杂,如酚类、香豆素、黄酮类、萜类、维生素 A、E、植物固醇及微量元素等,蜂胶抑制基因突变的作用机制也应是一个多方面作用的综合过程。如蜂胶具有很好的抗氧化作用,可以清除氧自由基。其含有的锌可以掺入 DNA 聚合酶的合成,促进 DNA 损伤的无误修复^[8];蜂胶中含有的香豆素、黄酮及酚类可以提高酶系统的活性,促进致癌剂灭活^[5],特别是生物黄酮素,可能通过阻止异源物质的酶

[7] Dally H, Hartwig A. Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells [J]. *Carcinogenesis*, 1997, 18(5): 1 021 - 1 026.

[8] Porter DW, Yakushiji H, Nakabeppu Y, et al. Sensitivity of *Escherichia coli*(MutT) and human(MTH1) 8-oxo-dGTPases to in vitro inhibition by the carcinogenic metals, nickel(II), copper(II), cobalt(II), and cadmium(II) [J]. *Carcinogenesis*, 1997, 18(9): 1 785 - 1 791.

[9] Coleman JE. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins [J]. *Ann Rev Biochem*, 1992, 61: 897 - 946.

[10] Hartwig A, Asmuss M, Ehleben I, et al. Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms [J]. *Environ Health Perspect*, 2002, 110(5): 797 - 799.

[11] Hartwig A. Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: differential effects on structure and function [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2001, 3(4): 625 - 634.

[12] Asmuss M, Mullenders LH, Eker A, et al. Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(11): 2 097 - 2 104.

来诱变中间体,或者抑制癌细胞增殖信号,更重要的是某些抗癌活性可能是直接阻断接受体或接受体信号^[5],蜂胶抗突变机制有待进一步深入研究,以便充分开发这种天然抗诱变物质的临床应用价值。

参考文献:

[1] 卢志强, 姜红祥. 植物活性成分与癌症的化学预防 [J]. *中草药*, 2002, 33(6): 563 - 565.

[2] 郭伽, 周立东. 蜂胶的化学成分研究进展 [J]. *中国养蜂*, 2000, 51(2): 17 - 18.

[3] 韩连堂, 王志萍, 李佩贤, 等. 蜂胶对环磷酰胺等四种诱变剂诱发突变的抑制作用 [J]. *中国公共卫生*, 2001, 17(5): 406 - 407.

[4] 周宗灿, 傅娟龄, 王莹, 等. 57 种中草药甲醇提取物体外抗突变作用的筛选 [J]. *卫生毒理学杂志*, 1989, 3(4): 212 - 214.

[5] 蔡蕾. 食物中非营养成分的生物学效应研究进展 [J]. *国外医学卫生学分册*, 1995, 22(5): 277 - 281.

[6] 徐厚铨. 环境致突变物和致癌物的抑制剂及其应用 [J]. *国外医学肿瘤学分册*, 1989, 16(1): 26 - 29.

[7] 刘向前. 细胞程序死亡和生物黄酮素 [J]. *中草药*, 2002, 33(2): 190.

[8] 周士新. 超氧化物歧化酶及其金属辅基与恶性肿瘤的关系 [J]. *国外医学卫生学分册*, 1995, 22(4): 228 - 231.