

Micronucleus Test of *Vicia Faba L.* Root Tip Cells to Assess the Anti-mutation Property of *Periplaneta Americana* and *Aspongopus Chinensis Dallas* Mixture

蚕豆根尖微核技术测定美洲大蠊和九香虫混合成分的抗突变性

宋文涛^{1/} 马志敏^{1,*/}季守莲^{1/}
刘光明^{2/} 施贵荣²
(1. 大理学院公共卫生学院 2. 大理学院药学院, 云南 大理 671000)

SONG Wen-tao¹, MA Zhi-min^{1,*}, JI Shou-lian¹,
LIU Guang-ming², SHI Gui-rong²
(1. School of Public Health; 2. School of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China)

【摘要】背景与目的：了解美洲大蠊和九香虫混合成分的抑突变作用。 材料与方法：将来自大理市周边七里桥、小关邑的两种蚕豆各分为环磷酰胺组、阴性对照组、美洲大蠊和九香虫混合成分组、美洲大蠊和九香虫混合成分 + 环磷酰胺组，共 4 组，利用蚕豆根尖微核技术，测定美洲大蠊和九香虫混合成分对环磷酰胺所诱导突变的抑制作用。 结果：美洲大蠊和九香虫混合成分 + 环磷酰胺处理组的根尖细胞微核率明显低于环磷酰胺组 ($P < 0.01$)，其微核抑制率分别为 60.5% (七里桥蚕豆) 和 52.5% (小关邑蚕豆)。 结论：美洲大蠊和九香虫混合成分可以降低环磷酰胺诱导的蚕豆根尖细胞的微核率，具有抑突变作用。

【关键词】美洲大蠊；九香虫；蚕豆；微核；环磷酰胺；抗突变

中图分类号：R730.1 文献编号：A 文章编号：1004 - 616X(2008)06 - 0475 - 02

【ABSTRACT】BACKGROUND AND AIM: To investigate the anti-mutation property of the *Periplaneta Americana* and *Aspongopus Chinensis Dallas* mixture. MATERIALS AND METHODS: Broad beans from Qiliqiao village and Xiaoguan yi village were divided into 4 groups, cyclophosphamide group, negative control group, *Periplaneta Americana* and *Aspongopus Chinensis Dallas* mixture group, *Periplaneta Americana* and *Aspongopus Chinensis Dallas* mixture + cyclophosphamide group. The purpose was to assess the anti-mutation property of *Periplaneta Americana* and *Aspongopus Chinensis Dallas* mixture by means of micronucleus test of *Vicia Faba L.* root tip cells. RESULTS: Compared with the cyclophosphamide group, the rates of micronucleus in the *Periplaneta Americana* and *Aspongopus Chinensis Dallas* mixture + cyclophosphamide group were lower. The inhibitory rates of *Periplaneta Americana* and *Aspongopus Chinensis Dallas* mixture + cyclophosphamide group were 60.5% (Qiliqiao) and 52.5% (Xiaoguan yi). CONCLUSION: *Periplaneta Americana* and *Aspongopus Chinensis Dallas* mixture could effectively inhibit the mutation induced by cyclophosphamide.

【KEY WORDS】*Periplaneta americana*; *Aspongopus Chinensis Dallas*; *Vicia faba L*; micronucleus; cyclophosphamide; anti-mutation

美洲大蠊 (*Periplaneta Americana*) 为昆虫纲有翅亚纲蜚蠊目蜚蠊科大蠊属昆虫，俗称“蟑螂”。九香虫 (*Aspongopus Chinensis Dallas*) 为昆虫纲半翅目蝽科昆虫。目前国内外学者已对美洲大蠊和九香虫进行了大量的研究，发现美洲大蠊对肺癌及恶性纤维癌有显著疗效^[1-3]，九香虫具有较强的止痛、抗癌作用^[4-5]。但对两

药联合用药的研究目前国内外暂无报道，大理民间有中医用 3 份美洲大蠊配 1 份九香虫治疗肺癌等恶性肿瘤，其疗效甚佳。我们旨在利用蚕豆根尖微核技术初步探索美洲大蠊和九香虫混合成分抗突变作用，为进一步研究美洲大蠊和九香虫的抗癌作用提供实验室依据。

收稿日期：2008 - 06 - 30；修订日期：2008 - 08 - 09
基金项目：大理学院科研基金资助项目 (2007X15)，国家自然科学基金 (30560181)
作者简介：宋文涛，(1985 -)，男，汉族，河南驻马店人，大理学院预防医学专业学生。
* Correspondence to: MA Zhi-min E-mail: mzhimin2125499@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料

蚕豆 (*Vicia faba* L.) 选自云南省大理市小关邑村和七里桥村; 美洲大蠊和九香虫提取物 (大理学院药学院刘光明教授提供); 环磷酰胺 (cyclophosphamide, CP); 微核染色液 (席夫试剂)、卡诺固定液: V 无水乙醇: V 冰醋酸 = 3: 1。

1.2 方法

1.2.1 微核实验 按国家环保局环境监测技术规范进行。选择颗粒饱满, 大小均匀的蚕豆种子, 蒸馏水浸泡 30 h, 其间换水 2 次, 待种子充分吸胀初生根长至 1~2 mm, 放入到垫有湿脱脂棉的解剖盘中, 上覆盖湿纱布, 于 25 °C 条件下催芽, 当初生根长至 1.0~2.0 cm 时, 随机分为阳性对照组 (CP 组)、阴性对照组、美洲大蠊和九香虫 3: 1 混合成分组 (10 μg/ml)、美洲大蠊和九香虫 3: 1 混合成分 + 环磷酰胺组 (10 μg/ml 美洲大蠊和九香虫混合成分 + 20 μg/ml 环磷酰胺各 1/2)。每组在室温下浸泡处理 4 h, 自来水冲洗后, 在 25 °C 温箱中用蒸馏水恢复培养 24 h, 切取根尖 1cm 左右于卡诺尔氏液中固定 36 h 后, 用蒸馏水冲洗 2 次, 再用 0.027 mol/L HCl、60 °C 水解 5~8 min, 水洗 2 次, 席夫试剂染色 30 min, 水洗 2 次, 最后用蒸馏水浸泡待检。

1.2.2 微核观察 随机选取各组蚕豆根尖, 常规压片, 高倍镜下观察蚕豆根尖分生组织区, 每个处理组观察 3 个根尖细胞, 每个根尖计数 1 000 个间期细胞, 按下式计算其微核率 (MCN %) 和抑制率 (%)。

$$\text{MCN} = \frac{\text{含有微核的细胞数}}{\text{观察细胞总数}} \times 1000\%$$

$$\text{抑制率} = \left(\frac{\text{对照组微核细胞数} - \text{实验组微核细胞数}}{\text{对照组微核细胞数}} \right) \times 100\%$$

1.2.3 统计学方法 实验数据使用 SPSS15.0 软件分析, 显著性检验采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 蚕豆根尖细胞微核率及抑制率分析

美洲大蠊和九香虫混合成分处理的蚕豆根尖细胞微核低于阴性对照组 ($P < 0.01$); 混合成分 + 环磷酰胺组根尖细胞微核率也低于环磷酰胺组 ($P < 0.01$)。美洲大蠊和九香虫混合成分对七里桥蚕豆根尖细胞微核的抑制率为 45.4%, 且对环磷酰胺诱导的七里桥蚕豆根尖细胞微核有明显的抑制作用, 其抑制率为 60.5% (表 1); 美洲大蠊和九香虫混合成分对小关邑蚕豆根尖细胞微核的抑制率为 41.7%, 且对环磷酰胺诱导的小关邑蚕豆根尖细胞微核也有明显的抑制作用, 其抑制率为 52.5% (表 2)。

表 1 七里桥蚕豆各组根尖细胞微核率及抑制率

Table 1 The rate of micronucleus and inhibition in each group of Qiliqiao broad bean

Group	MCN ($\bar{x} \pm s, \%$)	Rate of Inhibition (%)
Mixed ingredients	4.00 ± 1.00 *	45.4
Negative control	7.33 ± 1.15	-
Mixed ingredients + cyclophosphamide	5.67 ± 1.53 #	60.5
Cyclophosphamide	14.33 ± 1.53	-

Compared with negative control group, * $P < 0.01$; Compared with cyclophosphamide group, # $P < 0.01$.

表 2 小关邑蚕豆各组根尖细胞微核率及抑制率

Table 2 The rate of micronucleus and inhibition in each group of Xiaoguanyi broad bean

Group	MCN ($\bar{x} \pm s, \%$)	Rate of Inhibition (%)
Mixed ingredients	4.67 ± 1.55 *	41.7
Negative control	8.00 ± 1.00	-
Mixed ingredients + cyclophosphamide	6.33 ± 1.55 #	52.5
Cyclophosphamide	13.33 ± 1.15	-

Compared with negative control group, * $P < 0.01$; Compared with cyclophosphamide group, # $P < 0.01$.

2.2 七里桥和小关邑蚕豆根尖细胞微核率及抑制率对比分析

实验过程中, 随机选择两种蚕豆 [6], 并严格控制实验条件, 两组实验平行进行, 除保证两组实验所使用的蚕豆为不同地区外, 其他实验条件均一致。实验结果表明两种蚕豆微核率的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明实验具有很好的一致性, 结果可靠 (表 3)。

表 3 七里桥和小关邑蚕豆根尖细胞微核率的对比分析

Table 3 Comparison of the rate of micronucleus between Qiliqiao and Xiaoguanyi

Group	MCN ($\bar{x} \pm s, \%$)		P^*
	Qiliqiao	Xiaoguanyi	
Mixed ingredients	4.00 ± 1.00	4.67 ± 1.55	0.365
Negative control	7.33 ± 1.15	8.00 ± 1.00	0.574
Mixed ingredients + cyclophosphamide	5.67 ± 1.53	6.33 ± 1.55	0.401
Cyclophosphamide	14.33 ± 1.53	13.33 ± 1.15	0.265

Comparison of the rate of micronucleus between Qiliqiao and Xiaoguanyi, * $P > 0.05$.

3 讨论

微核是常用的遗传毒理学指标之一, 指示染色体的损伤情况, 微核产生的数量与诱变因子的致突变作用成正比, 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, 因此可以用微核率来评价诱变因子对癌变的影响程度。蚕豆根尖微核试验具有较高的可靠性和灵敏性, 蚕豆与小鼠在分类上属于同一个层次, 蚕豆细胞染色体的损伤可以在一定程度上反映同样暴露条件下高等动物遗传物质的损伤。1988 年国际化学品安全委员会组织了一次涉及世界 6 个国家 17 个实验

(下转第 489 页)

10.0 g/kg 范围内,对小鼠精子无致畸作用。

表 2 珍珠祛斑美容片小鼠精子畸形试验结果($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Results of sperm abnormality test of pearl anti-spot cosmetology slices in mice($\bar{x} \pm s$)

Dose (g/kg)	n	Sperms	Aberrative sperms	Frequencies of abnormality (%)
Negative control	5	5 × 1 000	18.00 ± 3.23	1.80 ± 0.33
Probiotics 2.5	5	5 × 1 000	17.20 ± 3.38	1.72 ± 0.42
5.0	5	5 × 1 000	15.60 ± 4.52	1.56 ± 0.47
10.0	5	5 × 1 000	16.80 ± 4.26	1.68 ± 0.35
MMC 0.0015	5	5 × 1 000	59.60 ± 9.64	5.96 ± 1.04*

Compared with control group, *P < 0.01

2.4 骨髓微核试验 结果见表 3,珍珠祛斑美容片与小鼠胸骨骨髓嗜多染红细胞微核发生率无剂量-反应关系。经 U 检验,各试验组与阴性对照组相比,微核发生率差异无统计学意义(P > 0.05),而阳性对照组与阴

表 3 珍珠祛斑美容片小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验结果($\bar{x} \pm s$, n = 5)

Table 3 Results of micronucleus test of bone marrow PCE cells of pearl anti-spot cosmetology slices in mice($\bar{x} \pm s$, n = 5)

Dose(g/kg)	PCE	Micronucleus	MNF(%)	PCE/NCE
Females				
Negative control	5 × 1 000	1.40 ± 1.29	1.40 ± 1.29	1.11 ± 0.19
Probiotics 2.5	5 × 1 000	1.80 ± 1.21	1.80 ± 1.21	1.06 ± 0.17
5.0	5 × 1 000	1.60 ± 1.55	1.60 ± 1.55	1.11 ± 0.15
10.0	5 × 1 000	1.40 ± 1.41	1.40 ± 1.41	1.12 ± 0.14
CP 0.04	5 × 1 000	19.6 ± 3.32	19.60 ± 3.32*	0.96 ± 0.09
Males				
Negative control	5 × 1 000	1.60 ± 1.34	1.60 ± 1.34	1.10 ± 0.10
Probiotics 2.5	5 × 1 000	1.80 ± 1.36	1.80 ± 1.36	1.05 ± 0.18
5.0	5 × 1 000	1.40 ± 1.15	1.40 ± 1.15	1.12 ± 0.13
10.0	5 × 1 000	1.80 ± 1.24	1.80 ± 1.24	1.08 ± 0.16
CP 0.04	5 × 1 000	20.20 ± 4.70	20.20 ± 4.70	0.97 ± 0.19

Compared with control group, *P < 0.01

(上接第 476 页)

室的大型试验,分别用几种不同的植物检测系统来鉴定未知样本的致突变性。结果表明,蚕豆根尖染色体畸变试验的假阴性率最低,可以检出最多的阳性致变物^[7]。环磷酰胺是一种染色体断裂剂,可以使遗传物质损伤产生微核等异常现象。从以上两组蚕豆的微核率来看,阴性对照(本底测定)均为 10%以下,符合本底条件。

本研究结果表明美洲大蠊和九香虫混合成分能有效抑制蚕豆根尖细胞微核率的升高,具有很好的抑制突变作用,为进一步研究美洲大蠊和九香虫混合成分的抗肿瘤作用及其机制提供依据。

参考文献:

[1] Britta T, Bernd W, Wolfgang B. Pharmacology of serotonin-

性对照组及各试验组比较差异均具有统计学意义(P < 0.05)。说明珍珠祛斑美容片在 2.5~10.0 g/kg 范围内,未引起小鼠骨髓嗜多染红细胞微核发生率的升高。

3 讨论

本次试验中,对珍珠祛斑美容片进行了 2 个阶段的毒性试验。在第一阶段急性毒性试验中,大鼠、小鼠经口灌胃给予珍珠祛斑美容片,其 MTD 均大于 20.0 g/kg 体重。据急性毒性分级标准判定,珍珠祛斑美容片属于实际无毒级别。在第二阶段遗传毒性试验中,通过小鼠精子畸形试验、微核试验和 Ames 试验,对珍珠祛斑美容片的短期诱变性进行研究,这 3 项试验结果均为阴性,说明在本试验剂量范围内(2.5~10.0 g/kg),该受试物未显示遗传毒性作用。珍珠祛斑美容片的人体推荐日用量为 2.0 g,因此根据以上结果,可以初步认为在推荐剂量范围内使用珍珠祛斑美容片是安全可靠的。

参考文献:

[1] 李春华,林强,裴重华.珍珠粉颗粒粒度与氨基酸体外溶出效果的关系[J].华西药学杂志,2002,17(5):334-335.
 [2] 蔡仁达.珍珠的营养学与药理学研究综述[J].科学养鱼,2000,(4):5-6.
 [3] 中华人民共和国卫生部.保健食品检验与评价技术规范[M].北京:卫生部卫生法制与监督司,2003:177-204.
 [4] 中华人民共和国卫生部.GB15193.1-15193.21-2003,食品安全性毒理学评价程序和方法[S].北京:中国标准出版社,2003:17-58.

induced salivary secretion in Periplaneta americana[J]. J Insect Physiol, 2007, 53(8): 774-781.

[2] 蒋永新,王熙才,金从国,等.美洲大蠊提取物对小鼠 3LL 肺癌的抑制作用及其机制探讨[J].中国肺癌杂志,2006,9(6):488-491.
 [3] 廖剑英.康复新治疗恶性纤维组织细胞瘤 1 例[J].大理学院学报,2003,2(3):92.
 [4] 林普莲.九香抗癌定痛散治癌痛 23 例观察[J].福建中医学院学报,2005,15(S1):123-124.
 [5] 潘大理.九香虫治愈血管瘤 4 例[J].中医杂志,1987,28(11):40.
 [6] 季守莲,宋正蕊,杨廷仕,等.应用两种大理州蚕豆作微核实验材料的筛选[J].癌变·畸变·突变,2004,16(1):52-53.
 [7] 臧宇,薛开先.蚕豆根尖微核试验的应用与发展[J].癌变·畸变·突变,1999,11(3):158-160.

