

螺旋藻抗突变作用的探讨

牛铁芹 穆效群 全国辉 姚小曼
(北京市卫生防疫站毒理科,北京 100013)

摘要:为探讨螺旋藻抗突变作用的机理,用钝顶螺旋藻(SPG)为受试物,用3种不同的给予方法观察其拮抗由黄曲霉毒素(AFB₁)所致的TA98菌株突变的作用。结果表明:SPG在较低浓度(40 mg/皿)即可通过抑制AFB₁对TA98的致突变作用,使突变菌落数明显减少;当SPG达到较高的浓度(100 mg/皿)时,还可通过直接灭活AFB₁的方式抑制AFB₁的致突变作用。其可能机制是由于SPG中含有胡萝卜素、Vitc和葡萄糖醛酸等成分。前两者都已被证实具有抗突变和清除自由基的功能,而葡萄糖醛酸则可与AFB₁结合使其灭活。结果还显示,SPG不能抑制AFB₁引起的已突变的TA98菌株的突变表达。

关键词:钝顶螺旋藻 抑制,遗传

中图分类号:R15;TS218 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2001)04-0009-04

自本世纪40年代以来,螺旋藻(SPG)作为一种食品已被证实有多种保健功能,因此对其营养成分及保健作用机理的研究成为近年来的热点,特别是它的抗诱变作用,引起了极大关注。目前人类生存环境中存在着大量的诱变剂,它们与人类肿瘤发生明显相关。因此有抗诱变功能的物质对提高人类的生活质量,降低恶性肿瘤的患病率以及提高人口素质都具有很重要的意义。本研究拟以钝顶螺旋藻(SPG)作为受试物,通过3种不同给予方法,探讨其对AFB₁所致的鼠伤寒沙门氏菌突变的拮抗作用机制,为进一步研究其抗诱变作用机理提供依据。

1 材料和方法

1.1 受试物 钝顶螺旋藻(SPG) 某保健食品生产厂。

1.2 受试菌株 选用鉴定合格的鼠伤寒沙门氏TA98菌株(由医科院肿瘤研究所提供)。

1.3 致突变物 黄曲霉毒素 中国预防医学科学院营卫所。

1.4 试样前处理 取试样100 g,加甲醇400 mL,蒸馏水100 mL,浸泡24 h后过滤,取过滤液250 mL,其试样浓度为0.2 g/mL,通过XAD-2树脂过柱,滤率为2 mL/min,用12.5 mL(8倍浓缩)甲醇洗脱,收集洗脱液,试样浓度为4 g/mL。

1.5 剂量设计 第一次试验根据预试验结果,设6个剂量组,即每皿试样量分别为50、100、200、400、800、1600 mg;另设试样溶剂对照、阳性溶剂对照、阴

性对照和阳性对照。

第二次验证,根据第一次实验结果,分别找出3个剂量—反应关系最明显的剂量段,依一定间隔再设6个剂量,即第一种给予方法,每皿试样量分别为0.004、0.04、0.4、4、40、100 mg;第二种给予方法,每皿试样量分别为12.5、25、50、100、200、400 mg;第三种给予方法剂量同第一次试验;另设试样溶剂、阳性溶剂、阴性对照和阳性对照。

1.6 方法 第一种方法 受试物直接灭活致突变物检测 取0.1 mL致突变物及0.1 mL受试物同时加入0.5 mL磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L,pH 7.4)中,加或不加S9于37℃水浴预培养20 min,再加入0.1 mL菌液,使成悬液。取适量该悬液做细菌存活实验后,其余均加入2 mL融化的45℃水浴顶层培养基。迅速倾入底层培养基,平放使之固化,37℃培养48 h,菌落计数。

第二种方法 受试物抑制致突变物对菌株的致突变作用检测 取0.1 mL受试物,0.1 mL致突变物与0.1 mL菌液共同加入0.5 mL磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L,pH 7.4)中,加或不加S9,于37℃水浴预培养20 min。取适量该悬液做细菌存活试验后,其余均加入2 mL融化的(45℃水浴)顶层培养基,迅速倾入底层培养基,平放使之固化,37℃培养48 h菌落计数。

第三种方法 受试物抑制已受致突变作用的菌株的突变表达试验 取0.1 mL致突变物与0.1 mL菌液同时加入0.5 mL磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L,pH

7.4)中,加或不加S9,于37℃水浴预培养20 min,然后离心(1000 r/m,5 min),再用磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L,pH7.4)冲洗2次,即加入缓冲液后离心沉淀细菌,弃上清液,洗后剩0.7 mL菌液,再加入0.1 mL受试物。取适量该悬液做细菌存活实验后,其余均加入2 mL融化的(45℃水浴)顶层培养基,迅速倾入底层培养基,平放使之固化,37℃度培养48 h,计数菌落数。

$$\text{抑制率公式 } F\% = \frac{G-H}{G-I} \times 100\%$$

式中: F ——抑制率

G ——致突变物对照组相对菌落数

H ——受试物组相对菌落数

I ——溶剂对照组相对菌落数

2 结果

2.1 第一次试验

钝顶螺旋藻对黄曲霉毒素的直接灭活作用见表

1。

表1 SPG直接灭活AFB₁

组别	SPG mg/皿	AFB ₁ 皿 μg/50 μL	菌落数		抑制率 %	
			- S9	+ S9	- S9	+ S9
SPG ₁	50	1	20.67 ±3.06	99.33 ±49.36	—	94.3
SPG ₂	100	1	20.06 ±3.05	58.00 ±24.98	—	99.5
SPG ₃	200	1	14.67 ±6.11	57.33 ±24.1	—	97.5
SPG ₄	400	1	22.67 ±4.16	34.33 ±17.04	—	99.3
SPG ₅	800	1	18.33 ±2.08	24.00 ±3.46	—	100.0
SPG ₆	1600	1	14.67 ±4.16	19.67 ±2.52	—	100.0
DMSO			21.67 ±2.98	27.67 ±2.52	—	99.8
甲醇			22.00 ±6.08	25.67 ±2.08	—	99.9
阴性对照			24.33 ±6.03	25.33 ±5.02	—	100.0
阳性对照			26.00 ±5.29	1333.33 ±288.68		

由表1可见,在不加S9情况下,AFB₁对TA98无致突变性,而加入S9回变菌落数即显著增加,低剂量组多数超过自发回变菌落数的两倍以上,故认定AFB₁为TA98的间接致突变物;而加入不同剂量的SPG后回变菌落数均明显降低,且在每皿50~

400 mg之间(除100 mg/皿外)均存在明显的剂量—反应关系。当剂量达每皿400 mg时,回变菌落数与自发回变数相比,无统计差异,抑制率接近100%。

钝顶螺旋藻抑制黄曲霉毒素对TA98菌株的致突变作用见表2。

表2 SPG抑制AFB₁对TA98菌株的致突变作用

组别	SPG mg/皿	AFB ₁ 皿 μg/50 μL	菌落数		抑制率 %	
			- S9	+ S9	- S9	+ S9
SPG ₁	50	1	21.33 ±2.13	144.00 ±66.09	—	90.3
SPG ₂	100	1	23.33 ±2.51	78.67 ±32.02	—	95.5
SPG ₃	200	1	21.33 ±3.21	27.67 ±15.04	—	99.8
SPG ₄	400	1	27.60 ±15.04	23.33 ±6.11	—	100.0
SPG ₅	800	1	26.33 ±11.84	17.66 ±2.52	—	100.0
SPG ₆	1600	1	18.67 ±1.53	11.33 ±6.11	—	100.0
DMSO			21.67 ±2.89	27.67 ±6.52	—	99.8
甲醇			22.00 ±6.08	25.61 ±2.08	—	99.9
阴性对照			24.33 ±6.03	25.33 ±5.03	—	100.0
阳性对照			26.00 ±5.29	1333.33 ±288.68		

由表2可见,各剂量组的SPG对AFB₁对TA98的致突变作用均有抑制作用,且在每皿50~200 mg时,剂量范围内存在明显的剂量—反应关系。当剂量达每皿200 mg时,抑制率接近100%。

另外采用第三种给予方式,未见SPG对AFB₁的致突变作用有抑制作用(数据未列出)。

2.2 第二次试验

钝顶螺旋藻对黄曲霉毒素B₁的直接灭活作用

见表 3。

由表 3 所列结果可见,各浓度的 SPG 均可灭活 AFB₁,且 TA98 的突变菌株随 SPG 浓度的增加而减少。即抑制率随 SPG 浓度的增加而增加,存在明显

的剂量反应关系。

钝顶螺旋藻抑制黄曲霉毒素 B₁ 对 TA98 菌株的致突变作用见表 4。

表 3 SPG 直接灭活 AFB₁

组别	SPG mg/皿	AFB ₁ 皿 μg/50 μL	菌落数		抑制率 %	
			- S9	+ S9	- S9	+ S9
SPG ₁	0.004	1	23.673 ±3.51	273.33 ±30.55	—	71.1
SPG ₂	0.04	1	24.33 ±5.86	160.67 ±34.78	—	84.9
SPG ₃	0.4	1	30.00 ±10.00	114.67 ±37.22	—	—
SPG ₄	4	1	23.67 ±4.51	115.33 ±41.48	—	90.6
SPG ₅	40	1	34.46 ±14.04	54.67 ±6.11	—	90.6
SPG ₆	400	1	26.67 ±6.11	36.33 ±15.95	—	100.0
DMSO			21.33 ±4.17	40.67 ±15.53	—	100.0
甲醇			23.33 ±4.16	35.33 ±5.03	—	100.0
阴性对照			36.67 ±11.69	38.67 ±15.31	—	100.0
阳性对照			24.00 ±6.00	850.00 ±150.00		

表 4 SPG 抑制 AFB₁ 对 TA98 菌株的致突变作用

组别	SPG mg/皿	AFB ₁ 皿 μg/50 μL	菌落数		抑制率 %	
			- S9	+ S9	- S9	+ S9
SPG ₁	12.5	1	27.67 ±2.52	240.00 ±60.00	—	75.2
SPG ₂	25	1	33.00 ±15.27	174.00 ±39.44	—	83.3
SPG ₃	50	1	21.00 ±3.61	100.00 ±17.08	—	92.4
SPG ₄	100	1	28.00 ±8.00	62.00 ±16.37	—	97.1
SPG ₅	200	1	22.00 ±2.00	22.33 ±1.15	—	100.0
SPG ₆	400	1	27.67 ±15.04	23.33 ±6.11	—	100.0
DMSO			21.33 ±4.17	40.67 ±15.53	—	99.8
甲醇			23.33 ±4.16	35.33 ±5.03	—	100.0
阴性对照			36.67 ±11.69	38.67 ±15.31	—	100.0
阳性对照			24.00 ±6.00	850.00 ±150.00		

由表 4 所列结果可见,各浓度的 SPG 均可抑制 AFB₁ 对 TA98 的致突变作用。且抑制率随 SPG 浓度的增加而增加,存在明显的剂量—反应关系。

3 讨论 很早以前就已有关于螺旋藻抗诱变作用的报道,但对其具体作用机制尚无确定理论解释,我们选用一种在预试验中证明对 AFB₁ 所致的鼠伤寒沙门氏菌突变有拮抗作用的 SPG,采用 3 种不同给予方法进行抗突变试验,藉以初步探讨 SPG 抗突变的机制。

在第一次研究中,我们依据预试验中找到的有效浓度的 2 倍为浓度梯度上下各设 2 个组,用 3 种不同的给予方法进行试验。在第一种给予方法中,发现每皿 50 mg 的 SPG 即可通过直接灭活致突变物的途径,实现抗诱变作用,且随 SPG 浓度的增加,突变菌落数呈下降趋势,有一定的剂量—反应关系,当浓度达到每皿 400 mg 时抑制率均达 100%。在第二

种给予方法中,发现每皿 50 mg 的 SPG 也可明显抑制 AFB₁ 对 TA98 的致突变作用,且抑制率亦随 SPG 浓度的增加而增加,当浓度达到每皿 200 mg 时,抑制率可达 100%。但是,第三种给予方法的试验结果显示,SPG 不能抑制 AFB₁ 引起的已突变的 TA98 菌株的突变表达,各试验组均未见抑制作用。

在第二次研究中为了得到明显的剂量—反应关系,缩小了浓度范围,结果显示,前两种给予方法,SPG 对 AFB₁ 引起的 TA98 的突变抑制作用均有明显的剂量—反应关系,且 SPG 在较低浓度(40 mg/皿)即可通过抑制 AFB₁ 对 TA98 的致突变作用,使突变菌落数明显降低,抑制率接近 100%;当 SPG 达到较高浓度每皿 100 mg 时,才能观察到直接灭活 AFB₁ 的机制,并使抑制率接近 100%。

大量的文献报告表明,SPG 中含有胡萝卜素、维生素 C、葡萄糖醛酸等物质。它们都已被证实具有

抗突变和清除自由基的功能。因此,我们认为 SPG 在小剂量即可发挥抑制 AFB₁ 对 TA98 的致突变作用,可能是其中的胡萝卜素和 VC 等抗突变成分的作用;而 SPG 对 AFB₁ 的直接灭活作用可能是因为它含有较多的葡萄糖醛酸能与 AFB₁ 结合,从而使 AFB₁ 失活。

总之,SPG 对 AFB₁ 引起的 TA98 菌株的突变确有明显的抑制作用,而且有的是通过直接灭活 AFB₁ 而显示作用,两种途径发挥作用的功效成分可能是胡萝卜素、VC 和葡萄糖醛酸等,其作用机制有待进

一步研究确定。

参考文献:

- [1] 田昌玉,等.螺旋藻产品的开发趋势[J].中国食品与营养,1997,(1):17—18.
- [2] 程双奇,等.螺旋藻的营养评价[J].营养学报,1990,12(4):415—417.
- [3] 陈冠敏.螺旋藻致突变性研究[J].海峡预防医学杂志,1997,3(1):19—21.
- [4] 刘中申.螺旋藻的研究进展与开发利用[J].中国药信息,1997,(5):18—19.

The study of anti-mutagenic effect of *Spirulina platensis* Geitler/Niu Tieqin, Mu Xiaoqun, Tong Guohui, et al. // Chinese Journal of Food Hygiene. 2001, 13(4): 9~12

Abstract: *Spirulina platensis* Geitler (SPG) has been proved as a multifunctional healthy food. The study was conducted by three different methods of administration in Ames test by us. TA98 was used as the testing strain. At a lower dose (40 mg/plate), SPG can inhibit the mutation effect of Aflatoxin B₁ (AFB₁) when SPG and AFB₁ were added into the reaction system simultaneously. When the mixture of SPG and AFB₁ were added into the reaction system after a pre-cultivation, the anti-mutagenic effect can be observed at a higher dose (100 mg/plate) of SPG. These results showed that SPG has an inactivation effect to AFB₁.

It was found that SPG can not inhibit the mutation expression induced by AFB₁.

Author's address: Niu Tieqin, Health and Anti-epidemic Station of Beijing, Beijing, 100013, PRC.

Key Words: *Spirulina platensis* Geitler Suppression, Genetic

卫生部文件

卫法监发[2001]158号

卫生部关于真菌类保健食品 评审规定有关问题的补充通知

各省、自治区、直辖市卫生厅局:

现就我部于今年3月下发的《真菌类保健食品评审规定》执行中的一些具体问题补充通知如下:

一、申报企业自己采购菌种后经过发酵或培养生产保健食品的,应当提供《真菌类保健食品评审规定》第五条要求提供的所有资料,并符合第七条规定的各项条件。

二、申报企业购买的菌种是经过发酵或培养后的菌粉生产保健食品的,生产加工工艺只是混合、灌装过程,《真菌类保健食品评审规定》中第五条第5项至第9项的资料可由菌种原料供应商提供复印件(加盖原料供应商公章)。

中华人民共和国卫生部

二〇〇一年六月七日