

Detection of Antimutagenicity of Ginsenoside Re by TK Gene and HGPRT Gene Mutation Test

用 TK 基因和 HGPRT 基因突变试验检测人参皂甙 Re 的抗诱变性

LEI Fang¹, WANG Ya-nan², ZHANG Li-shi^{1,*}

(1. Department of Nutrition and Food Hygiene, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610041, Sichuan, China)

雷方¹/王亚男²/张立实^{1,*}

(1. 四川大学华西公共卫生学院营养与食品卫生学教研室, 四川 成都 610041; 2. 四川师范大学生命科学院, 四川 成都 610041)

【摘要】背景与目的: 用 TK 基因和 HGPRT 基因突变试验评价人参皂甙 Re 的抗诱变性, 为其进一步的开发利用提供资料。材料与方 法: 设人参皂甙 Re 12.5、25、50、100 $\mu\text{g/ml}$ 分别与致突变物甲基磺酸甲酯 (MMS) 5 $\mu\text{g/ml}$ 同时处理 TK6 细胞的实验组, 同时设溶剂对照组 (1% DMSO), 阳性诱变对照组 (MMS 5 $\mu\text{g/ml}$) 和抗诱变阳性对照组 (VitC + MMS), 各组处理 TK 细胞 4 h 后, 采用微孔板法检测 TK 和 HGPRT 两个位点的突变频率。结果: 随着剂量的增加, 人参皂甙 Re 拮抗 MMS 诱变性的作用增大, 表现在 TK 和 HGPRT 两个位点突变频率均较阳性诱变对照组降低, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 人参皂甙 Re 具有拮抗 MMS 诱导的 TK 基因和 HGPRT 基因突变的作用; TK 基因突变试验比 HGPRT 基因突变试验更为敏感。

【关键词】 人参皂甙 Re; TK6 细胞; TK 基因突变试验; HGPRT 基因突变试验

中图分类号: Q343.1*3

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2008)06-0421-03

【ABSTRACT】 BACKGROUND AND AIM: To detect and evaluate the antimutagenicity of ginsenoside Re by TK gene and HGPRT gene mutation tests. MATERIALS AND METHODS: The TK6 human lymphoid cells were exposed to ginsenoside Re at concentrations 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ simultaneously with 5 $\mu\text{g/ml}$ of methyl methanesulfonate (MMS) for 4 h. Determination of mutant frequency of TK locus and HGPRT locus were performed by using the microwell method. RESULTS: The mutant frequencies of TK locus and HGPRT locus after treatment with ginsenoside Re were significantly suppressed compared with the MMS control, in a dose-dependent manner. CONCLUSION: Ginsenoside Re had obvious inhibitory effect on TK gene and HGPRT gene mutation induced by MMS. TK6 could be used for both TK and HGPRT gene mutation tests, and TK gene mutation test was more sensitive than that of HGPRT in detection of ginsenoside Re antimutagenicity.

【KEY WORDS】 ginsenoside Re; TK6 cell; TK gene mutation test; HGPRT gene mutation test

人参皂甙 Re (ginsenoside Re) 是人参三醇皂甙单体, 是人参皂甙发挥生物活性作用最重要的活性成分之一。研究表明, 人参皂甙 Re 具有抗炎、抗氧化、稳定细胞膜、清除氧自由基、抗癌防癌、调节免疫、保护心肌、降血糖等作用^[1], 但对其抗诱变性的研究较为少见。

TK (thymidine kinase) 基因突变试验和 HGPRT (hypixanthine-guanine phosphoribosyl transferase) 基因突变

试验是较常用的体外短期致突变试验。TK6 细胞是人类淋巴母细胞, 其 TK 基因为杂合型 ($TK^{+/-}$), 故可用于测定 TK 位点突变的发生从而评价受试物的诱变性。本文以 TK6 细胞为靶细胞, 同时采用 TK 基因突变试验和 HGPRT 基因突变试验评价人参皂甙 Re 的抗诱变性, 为人参皂甙 Re 进一步的开发利用提供科学依据, 并为将 TK6 细胞推广运用于 TK、HGPRT 基因突变试验和评价

收稿日期: 2008-04-22; 修订日期: 2008-06-20

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重大项目 (2006BAK02A07、2006BAD27B08)

作者简介: 雷方 (1981-), 女, 四川省峨眉山市人, 硕士, 研究方向: 食品安全性与保健功能评价。E-mail: leifang1981@126.com

* Correspondence to: ZHANG Li-shi, E-mail: lishizhang_56@163.com

化学物的抗诱变性积累资料。

1 材料与方法

1.1 细胞系 人类淋巴母细胞 TK6, 由日本国立卫生研究所提供, 基因型为 $TK^{+/-}$ 。用含 10% 马血清、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 丙酮酸钠、100 U/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的 RPMI 1640 培养液 (96 孔培养板上使用含 20% 马血清的 RPMI 1640 培养液), 在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 、饱和湿度下常规悬浮培养。

1.2 主要材料和试剂 人参皂甙 Re (ginsenoside Re) 购自由中国药品生物制品检定所 (中药化学对照品, 纯度 100%)。甲基磺酸甲酯 (methyl methanesulfonate, MMS)、丙酮酸钠 (sodium pyruvate)、次黄嘌呤 (hypoxanthine)、氨基蝶呤 (aminopterin)、脱氧胞苷 (deoxycytidine)、胸腺嘧啶核苷 (thymidine)、维生素 C (Vit C)、三氟胸苷 (trifluorothymidine, TFT)、6-硫代鸟嘌呤 (6-thioguanine, 6-TG) 均购自 Sigma。

1.3 实验步骤

1.3.1 清除 $TK^{-/-}$ 、 $TK^{-/0}$ 基因型和 HGPRT⁻ 基因型的自发突变细胞 [2] 用 CHAT [3] 培养基 (1.0 $\times 10^{-5}$ mol/L 脱氧胞苷, 2.0 $\times 10^{-4}$ mol/L 次黄嘌呤, 1.0 $\times 10^{-7}$ mol/L 氨基蝶呤, 1.75 $\times 10^{-5}$ mol/L 胸苷) 处理 TK6 细胞 48 h, 转移至无氨基蝶呤的 CHAT 培养基培养 72 h。

1.3.2 试验分组及处理 测定 TK6 细胞在人参皂甙 Re + MMS 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理后的相对悬浮生长率 (relative suspend growth rate, RSG), 在 RSG 的 20% ~ 80% 范围内, 以等比设 4 个剂量组 (即 100、50、25、12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 另外再设 1 个溶剂对照组 (1% DMSO)、1 个阳性诱变对照组 (MMS 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 和 1 个抗诱变阳性对照组 (Vit C 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + MMS 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。用 RPMI 1640 培养液调整细胞密度为 5.0 $\times 10^5/\text{ml}$, 每组取 20 ml 加入 50 ml 离心管中。分别加入上述 4 个不同浓度的人参皂甙 Re、溶剂对照 (DMSO)、阳性诱变对照 (MMS) 和抗诱变阳性对照 (Vit C + MMS) 振荡处理 4 h 后 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 重悬浮于培养液中, 并调整细胞密度为 2 $\times 10^5/\text{ml}$ 。

1.3.3 第 0 d 平板接种效率 (plating efficiency, PEO) 的测定 将处理后的 TK6 细胞, 每组均用培养液梯度稀释细胞浓度至 8 个/ml 的细胞悬液 25 ml (阴性对照组为 50 ml)。接种于 96 孔板 (每孔加 0.2 ml, 平均每孔 1.6 个细胞), 每个剂量接种一块板 (用细胞悬液 25 ml), 溶剂对照接种 2 块板。置 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 饱和湿度培养箱内培养 14 d 后, 计数每块培养板有集落生长的孔数。

1.3.4 TK 基因和 HGPRT 基因表达培养 将 1.3.3 剩余的细胞调整密度至 2 $\times 10^5/\text{ml}$, 表达培养 7 d。前 3 d 每天计数细胞密度, 保持细胞密度在 1 $\times 10^6/\text{ml}$ 以下, 并计算每日细胞增长率 (daily cell growth, DCG), 据此计算 3 d 内相对悬浮增长率 (RSG)。公式如下:

$$\text{RSG} = \text{处理组} (\text{DCG}_1 \times \text{DCG}_2 \times \text{DCG}_3) / \text{对照组} (\text{DCG}_1 \times \text{DCG}_2 \times \text{DCG}_3)$$

$$\text{DCG} = \text{次日细胞密度} / \text{当日调整的细胞密度}$$

式中: DCG1、DCG2、DCG3 分别是表达期第 1 d、第 2 d 和第 3 d 的细胞增长率。

1.3.5 第 3 d 和第 7 d 平板接种效率 PE3、PE7 的测定 分别取经 3 d 表达培养和 7 d [4] 表达培养后的细胞悬液, 接种于 96 孔板, 培养 14 d 后计数每块培养板有集落生长的孔数。接种方法同 1.3.3。计算相对活力 (relative viability, RV), 公式如下:

$$\text{RV} = \text{PE}_3 (\text{处理组}) / \text{PE}_3 (\text{溶剂对照组}) \times 100\%$$

1.3.6 突变频率 (mutation frequency, MF) 测定 处理后的细胞经 3 d 表达培养后, 用培养液调整密度至 1 $\times 10^5/\text{ml}$, 加入 TFT, 使其终浓度为 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 混匀, 以 200 $\mu\text{l}/\text{孔}$ (20 000 个细胞/孔) 接种于 96 孔培养板 (每组 2 板, 溶剂对照接种 4 板)。置 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 饱和湿度培养箱内培养 14 d 后, 计数肉眼可见的正常生长集落 (normal growth colony, NC), 每孔再追加含 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TFT 的培养液 50 μl , 继续培养 14 d 后, 观察并计数缓慢生长集落 (slow growth colony, SC)。另外将处理后的细胞经 7 d [4] 表达培养后, 加入 6-TG, 使其终浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 同样方法接种平板。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度下培养 14 d 后, 计数有突变集落生长的孔数, 慢生长集落比例 (rate of slow-growth colonies, RSC), RSC 只用于 TK 基因突变实验。公式如下:

$$\text{RSC} = \text{SC} / (\text{NC} + \text{SC})$$

式中: NC 为正常生长集落数, SC 为缓慢生长集落数。突变频率的计算:

$$\text{TK-MF} = [-\ln(\text{EW}/\text{TW}) / 20\ 000] / \text{PE}_3$$

$$\text{HGPRT-MF} = [-\ln(\text{EW}/\text{TW}) / 20\ 000] / \text{PE}_7$$

式中: EW 和 TW 分别为 TFT 选择平板上无集落的孔数和总孔数, 20 000 为每孔接种细胞数。

1.3.7 突变指数 (mutation index, MI) 测定 通过突变频率计算突变指数, 比较同组间不同方法的突变指数。公式如下:

$$\text{MI} = [\text{MF} (\text{处理组}) / \text{MF} (\text{溶剂对照组})] \times 100\%$$

1.4 统计学方法及结果判定 用 Mutant™ 软件进行 TK 和 HPRT 突变频率计算和剂量效应线性关系分析, 其它数据用 SPSS11.5 进行方差分析和秩和检验。人

参皂甙 Re 两个或两个以上剂量组与阳性诱变对照组突变频率有显著性差异,且有剂量反应关系可判定为实验结果阳性^[5]。

2 结 果

2.1 人参皂甙 Re 的细胞毒性结果 受试物对细胞的毒性大小,一般通过细胞毒性指标,如相对悬浮增长率(RSG)、相对存活率(RV)等来反映。从表 1 可以看出,阳性对照组的 RSG、RV 均低于其他组。而人参皂甙 Re 与 MMS 联合作用组 RSG、RV 有升高趋势,但剂量-效关系不太好,可能是由于加入了 MMS 后,细胞毒性较大的原因。

2.2 TK、HGPRT 基因突变试验结果 4 个剂量组的人参皂甙 Re 与 MMS 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 同时处理 TK6 细胞后,各剂量组的 TK 基因突变频率均较 MMS 组降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。当人参皂甙 Re 浓度为 100、50、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,HGPRT 基因突变频率较 MMS 组降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。即人参皂甙 Re 与 MMS 同时处理 TK6 细胞时有抑制 MMS 诱导的 TK 基因和 HGPRT 基因突变的作用。除溶剂对照组 MI 为 1 外,其余各组诱导 TK6 细胞的 TK 基因突变指数 (TK-mutation index) 均高于 HGPRT 基因突变指数 (HGPRT-mutation index),差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 TK、HGPRT 基因突变试验结果

Table 1 Results of TK and HGPRT mutation assay

| Groups | RSG3 ($\times 10^{-2}$) | RV3 ($\times 10^{-2}$) | TK-MF ($\times 10^{-6}$) | TK-MI | HGPRT-MF ($\times 10^{-6}$) | HGPRT-MI |
|---|---------------------------|--------------------------|----------------------------|-------|-------------------------------|-----------|
| 1% DMSO | 100.00 | 100.00 | 3.21 \pm 0.77 | 1.00 | 1.52 \pm 0.42 | 1.00 |
| Re 12.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MMS | 16.17 | 34.20 | 111.70 \pm 2.37 * | 34.80 | 39.97 \pm 2.23 | 26.30 # # |
| Re 25.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MMS | 18.61 | 45.60 | 80.09 \pm 3.44 * | 24.95 | 27.34 \pm 1.65 * | 17.99 # # |
| Re 50.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MMS | 23.50 | 37.79 | 74.92 \pm 3.56 * | 23.34 | 15.57 \pm 1.19 * | 10.24 # # |
| Re 100.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MMS | 23.47 | 49.95 | 44.93 \pm 1.21 * | 14.00 | 11.90 \pm 0.56 * | 7.83 # # |
| 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MMS | 16.11 | 26.49 | 174.40 \pm 7.07 # | 54.33 | 42.06 \pm 2.07 # | 27.67 # # |
| VitC 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MMS | 26.30 | 30.73 | 87.57 \pm 6.41 * | 27.28 | 26.94 \pm 0.90 * | 17.72 # # |

Compared with the MMS control group, * $P < 0.05$; compared with the DMSO control group, # $P < 0.05$; compared with the TK-MI, ## $P < 0.05$.

3 讨 论

人参皂甙 Re 具有较多的生物学活性,已经广泛应用于食品、药品、日化等行业。但目前对于其抗诱变性作用的报道较为少见。本研究通过比较用致突变剂 MMS 与人参皂甙 Re 联合处理细胞和用 MMS 单独处理细胞产生的 TK 和 HGPRT 基因突变频率的差异,从而检测和评价人参皂甙 Re 的抗诱变性。两种基因突变试验的结果均显示人参皂甙 Re 具有抑制 MMS 诱导的基因突变的作用。

进一步比较同一组中 TK 基因和 HGPRT 基因的突变频率,发现 TK 基因突变指数显著高于 HGPRT 基因突变指数,说明 TK 基因突变试验的灵敏度高于 HGPRT 基因突变试验,这与已有的研究相符^[5]。这可能是由于 TK 基因突变试验不仅可以检出发生于 TK 位点的点突变、小缺失,还能检出包括 TK 位点在内的大缺失、易位、重组甚至染色体非整倍性等广泛的遗传学改变,故具有较高的检出灵敏度和较广的检测谱,而 HGPRT 基因突变试验只能检出点突变和小缺失,而对体细胞重组、染色体不分离及超过 3Mb 的缺失等大范围突变、致死性突变则检出率较低^[6]。但 HGPRT 基因突变试验的自发突变率较低,特异度较高,可以补充 TK 基因突变试验特异度较低的缺点。

本研究表明,TK 和 HGPRT 基因突变实验均可有效

检测出人参皂甙 Re 的抗诱变性。TK6 细胞除可用于 TK 基因突变试验外,还可用于 HGPRT 基因突变试验,且来源于人类,实际意义较大,故建议推广其诱变和抗诱变试验系统中的应用。两种基因突变试验各有其优缺点,同时采用,综合分析,可使实验结论更为可靠。

参 考 文 献 :

- [1] 陈彩霞,张宏艳. 人参皂甙 Re 的研究进展 [J]. 国外医学 儿科学分册,2004,31(7):110-112.
- [2] 刘胜学,曹佳,安辉,等. 昆明山海棠对人白血病细胞 HPRT 位点的影响 [J]. 第三军医大学学报,1999,23(2):113-115.
- [3] Liber HL, Thilly WG. Mutation assay at the thymidine kinase locus in diploid human lymphoblasts [J]. Mutat Res, 1982, 94(2):467.
- [4] Leger C, Drobetsky EA. Modulation of the DNA damage response in UV-exposed human lymphoblastoid cells through genetic-versus functional-inactivation of the p53 tumor suppressor [J]. Carcinogenesis, 2002, 23(10):1631-1639.
- [5] 张勇,张立实. 两种人类淋巴瘤细胞 TK/HPRT 基因突变实验比较研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 2007, 19(1):36-38.
- [6] Nuij-van Dalen AG, Buuren-van Seggelen VH, Mulder A, et al. Isolation and molecular characterization of spontaneous mutants of lymphoblastoid cells with extended loss of heterozygosity [J]. Mutat Res, 1997, 374(1):51-62.

