

原位缺口翻译技术检测兴安升麻总皂甙的抗突变作用

林 新 李 莘¹ 李文魁 蔡有余¹ 肖培根

中国医学科学院药用植物资源开发研究所 北京 100094

¹中国医学科学院实验动物研究所 北京 100021

摘要 本文采用原位缺口翻译技术,液闪计数测定,观察了兴安升麻总皂甙拮抗诱变剂丝裂霉素C(MMC)对人外周血细胞的致突变作用。结果表明:兴安升麻总皂甙具有很强的抗突变作用,同时提示:此技术是1种快速、灵敏、定量检测DNA损伤的方法。

关键词 原位缺口翻译;兴安升麻;总皂甙;抗突变;丝裂霉素C

IN SITU NICK TRANSLATION METHOD REVEALS THE ANTIMUTAGENIC EFFECT OF THE TOTAL SAPONINS OF *CIMICIFUGA DAHURICA*

Lin Xin, Li Ge¹, Li Wenkui, Cai Youyu¹, Xiao Peigen

Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100094

¹Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021

Abstract The antimutagenic effect of the total saponins of *Cimicifuga dahurica* on mutagenicity of normal human peripheral blood cells induced by MMC were quantitatively detected by using in situ nick translation method and liquid scintillation counting. The results showed that the total saponins of *Cimicifuga dahurica* had strong antimutagenic effect and in situ nick translation method provided a rapid and sensitive quantitative assay for detecting DNA damage.

Key words in situ nick translation; *cimicifuga dahurica*; total saponins; antimutation; mitoxmycin

兴安升麻 (*Cimicifuga dahurica* (Turca.) Maxim)作为民间常用中草药已有1千多年的历史。宋朝前,升麻主要用于解“毒”,对中医辨证时定性为“毒”的情况,如“温毒”、“火毒”、“疫毒”和误食某些

药物或食物引起的中毒等均有不同程度的解“毒”疗效⁽¹⁾。宋朝后,升麻传统疗效为散风解毒、透疹、去风湿,升阳止泻治疗子宫下垂、胃下垂等疾病。现代药理研究表明:兴安升麻具有抗炎、镇痛作用⁽²⁾。

但在分子水平上检测兴安升麻的抗突变作用尚未见报道,为此,我们进行了这方面的工作。

材料和方法

1. 主要试剂

1.1. 兴安升麻总皂甙: 为药植所化学室博士李从军从辽宁本溪采集的兴安升麻 (*Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim) 的根茎中提取的水提物。

1.2. 缺口翻译试剂盒: 华美生物工程公司产品。

1.3. *E.Coli* DNA 聚合物 I: 华美生物工程公司产品。

1.4. 丝裂霉素 C(MMC): Sigma 公司产品。

1.5. $^3\text{H-TdR}$: 北京原子能所产品。

2. 方法

2.1. 细胞培养及其处理: 将健康人外周静脉抗凝血接种于 24 孔培养板中 (100 μl /孔), 每孔加入 PHA 5mg 及含 10% 的小牛血清 RPMI 1640 培养液至 1ml, 37 $^{\circ}\text{C}$ 饱和湿度下培养 24h 后, 分别加入致突变剂 MMC (0.05 μg /ml) 和不同浓度的兴安升麻总皂甙, 阴性对照组每孔加等量的 RPMI 1640 培养液, 继续培养 24h。

2.2. 缺口翻译: 收集上述细胞于小试管中, 离心 (900r/min) 后用 PBS 洗涤 1 次, 于各管中依次加入下列试剂: (1) 核苷酸混合液 (dGTP, dCTP, dATP 等量混合) 5 μl ; (2) 缺口翻译缓冲液 5 μl ; (3) $^3\text{H-TdR}$ (1mCi/ml) 5 μl ; (4) 无菌去离子水 23 μl ; (5) *E.coli* DNA 聚合酶 I (IU/ml) 5 μl , 将上述反应管迅速放入 15 $^{\circ}\text{C}$ 水浴, 反应 1h 后, 每管加 5 μl 终止液终止反应。

2.3. 液闪测定: 将上述终止反应的各管细胞转移至抽滤玻璃纤维纸上, 依次用

10ml 蒸馏水破细胞, 10ml 5% 三氟醋酸去细胞蛋白, 10ml 无水乙醇固定细胞 DNA 进行抽滤, 用 Beckman 闪烁仪测定 Cpm 值。

结果

MMC 对细胞 DNA 有明显的损伤作用, 但若同时加入不同浓度的兴安升麻总皂甙, 其对 MMC 致突变作用有不同的拮抗, 随着兴安升麻总皂甙的浓度增高, 其拮抗作用逐渐增强, 见表 1 及图 1、2。经统计学处理, 与阳性对照组和阴性对照组比较, 分别有显著统计学差异 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$),

表 1 兴安升麻拮抗 MMC 的致突变作用

| 组别 | MMC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | 兴安升麻 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | cpm ($\bar{x} \pm s$) |
|-------|------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| 阴性对照组 | - | - | 3278.00 \pm 562.29* |
| 阳性对照组 | 0.05 | - | 6094.67 \pm 461.65** |
| 高剂量组 | 0.05 | 175.00 | 457.00 \pm 163.01 |
| 中剂量组 | 0.05 | 43.75 | 1177.33 \pm 239.50 |
| 低剂量组 | 0.05 | 10.94 | 1696.00 \pm 254.16 |

* 与阴性对照组比较 $P < 0.01$

** 与阳性对照组比较 $P < 0.05$

讨论

已有报道⁽³⁾, MMC 具有较强诱发姐妹染色单体交换频率升高和染色体畸变的效应, MMC 诱发的染色体畸变多为单体断裂和单体交换, MMC 的结构与烷化剂相似, 其损伤 DNA 的机制一般认为是由于 MMC 的活性基因与碱基 (主要是鸟嘌呤) 结合所致。

兴安升麻总皂甙具有广泛的生物学活性, 考虑到升麻传统的解“毒”疗效及现代研究的抗炎作用, 我们进行了兴安升麻的抗突变实验, 结果表明兴安升麻总皂甙具有拮抗 MMC 的致突变作用, 其作用机制可能与兴安升麻能够提高抗氧化酶 (SOD, GSH-Px, CAT) 活性和解酶酶谷胱甘肽转

硫酶(GST)的活性⁽⁴⁾, 清除致突变剂产生的亲核基因及减少自由基的产量有关, 详细

作用机制有待进一步探讨.

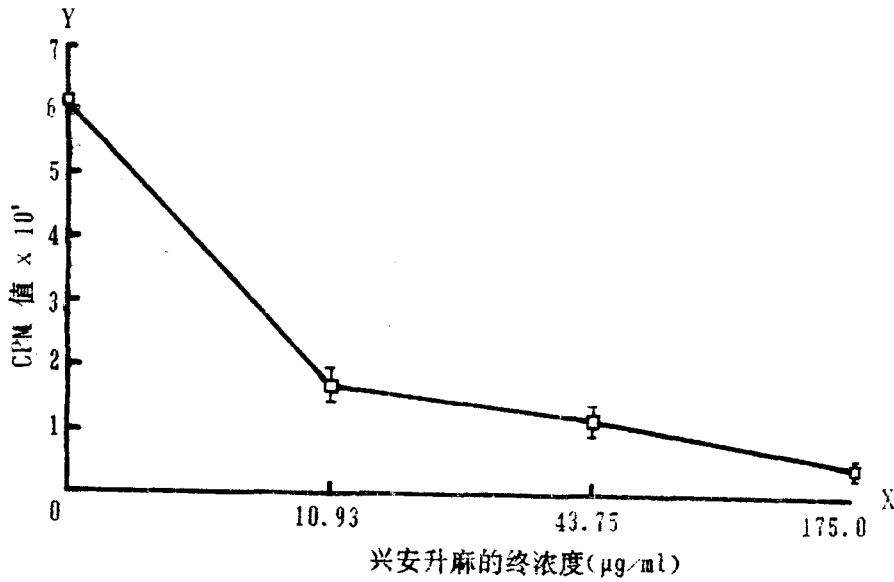


图1 兴安升麻的剂量与其阻断丝裂霉素 C(MMC)诱导染色体单链断裂的关系

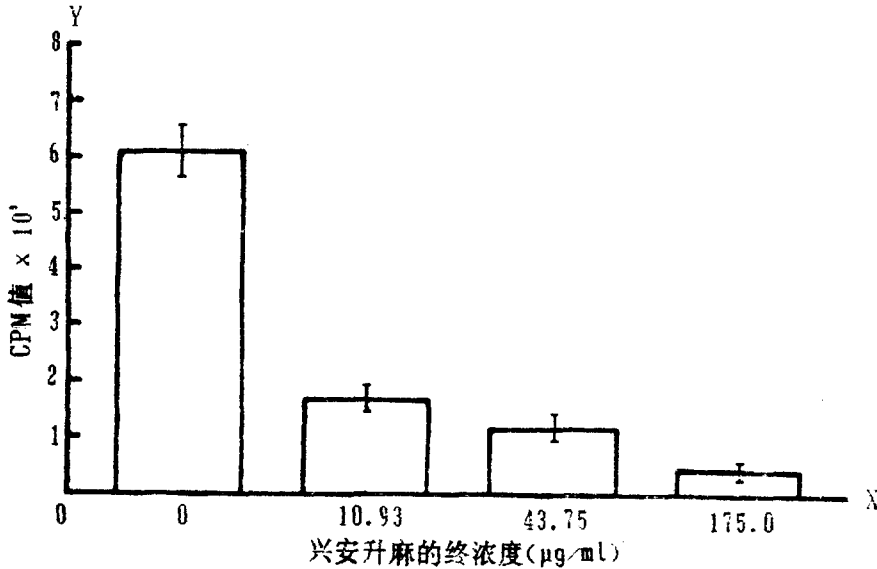


图2 兴安升麻的剂量与其阻断丝裂霉素 C(MMC)诱导染色体单链断裂的关系

本实验提示原位缺口翻译技术, 液闪测定是 1 种十分敏感的定量检测 DNA 损伤的方法. 其原理在于大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 对 DNA 缺口有剪除与连接核苷酸

的能力, 同时可将反应混合液中的核苷酸三磷酸来代替原来的核苷酸⁽⁵⁾. 因此新合成的核苷酸量可反映出 DNA 链的损伤.

(下转第 13 页)

而增加 ($P < 0.01$), 呈典型的剂量-效应关系。在我们的实验中, MMC、NiSO₄、B[a]P、CSE 等不同类型的诱变剂均可直

接或间接诱剂发细胞微核的形成, 表明 CB 微核法适用于多种不同类型环境诱变剂的检测。

表 4 不同细胞株对 B[a]P 和 CSE 代谢活化能力反应的差异

| 细胞株 | 诱变剂 | S9 | CB 微核率% | S9+与 S9-间的 P 值 |
|----------------|-------------------------|----|---------|----------------|
| CHL | CSE (10 μ g/ml) | + | 97* | >0.05 |
| | | - | 88* | |
| | B[a]P (5 μ g/ml) | + | 58* | <0.05 |
| | | - | 31 | |
| 对照组 | - | 26 | / | |
| BALB/C -3T3 | CSE (5 μ g/ml) | + | 89* | >0.05 |
| | | - | 97* | |
| | B[a]P (5 μ g/ml) | + | 106* | <0.01 |
| | | - | 53* | |
| 对照组 | + | 30 | >0.05 | |
| | - | 20 | | |

* 与对照组比较微核率的增高有统计学意义($P < 0.05$)

参考文献

1. Fenech M, et al. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 1985;147(1):29.

2. 程书钧, 等. 体外培养细胞微核试验的初步研究. *中华肿瘤学杂志* 1986;8(2):90.

3. Wu Zhongjiang, et al. Induction of morphological transformation by coal-dust extract in BALB/3T3 A31-1-13 cell line. *Mutat Res* 1990; 242(3):225.

(上接第 38 页)

该技术是在分子水平上反映遗传物质的改变程度, 所以其敏感性要比诸如检测染色体畸变、断裂、姐妹染色单体交换频率改变、微核率改变以及碱洗脱与荧光分析法^(6,7)敏感得多且更具有价值。

目前国内学者章静波等⁽⁸⁾报道的利用原位缺口翻译技术检测药物对细胞 DNA 的断裂损伤, 采用的是放射自显影方法, 而本实验所采用的是放射自显影方法, 不仅简化了实验步骤、缩短了实验周期, 而且还提高了实验的敏感性。因此, 可以预测该技术在环境诱变因子的筛选及研究其对细胞 DNA 的损伤、研究抗肿瘤、抗致畸、抗突变药物的机制方面必将得到日益广泛的应用。

参考文献

1. 方药中. 谈我对升麻的认识及临床运用经验. *辽宁中医杂志* 1981;5(1):32.

2. 柴田丸, 等. 生药[升麻]的药理研究——升麻的抗炎作用. *药理学杂志* 1977;8(7):911.

3. 王亚平, 等. 丝裂霉素C诱发染色体畸变的量效关系与特异性断裂点观察. *癌变·畸变·突变* 1990; 2(3):11.

4. 林新, 等. 兴安升麻总皂甙对大鼠肝微粒体酶活性的影响. *中国实验动物学杂志* 1993;5(1):13.

5. 章静波, 等译. 分子生物学实用方法.(Schleif RF, 等著). 第1版, 北京:人民卫生出版社, 1985;151-157.

6. Anai H, et al. In Situ Nick Translation method reveals DNA strand scission in HeLa Cells following heat treatment. *Cancer Letters* 1988;40(1):33.

7. Dyer KA, et al. Analysis of inactive X chromosome structure by In Situ Nick Translation. *Chromosome (Berl)* 1985;92(3):209.

8. 章静波, 等. 原位缺口移位技术检测药物对细胞DNA的断裂损伤. *细胞生物学杂志*. 1991;13(1):44.