DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.02.016

昆明山海棠对人白血病细胞 HPRT位点的影响

刘胜学* 曹 佳 安 辉 杨明杰 敖 琳 杨录军 (第三军医大学预防医学系分子毒理学教研室)重庆, 400038

提 要 目的:研究昆明山海棠对人白血病细胞 HL-60 HPRT位点的影响。方法:用 THH水溶液对 HL-60细胞进行浓度梯度染毒,不同时间点进行单细胞微孔接种,计数阳性克隆,测定接种存活率、克隆效率和突变频率。结果: THH染毒细胞的突变频率,在处理剂量 3.35~ 20.10 mg/ml范围内,具有明显的剂量-反应关系。但随着 THH的浓度增高至 33.50 mg/ml组,由于细胞存活率太低,细胞数不够最后接种要求,不能继续进行。这一现象可能与 THH的细胞毒性有关。结论: THH对 HL-60细胞具有肯定的致突变性,但只是在一定的剂量范围内遵循剂量反应规律。

关键词 昆明山海棠; HPRT位点;致突变作用; HL-60细胞
中图法分类号 R733.72

昆明山海棠 [Tripterygium Hypoglaucum (Levl) Hutch, THH]是一种传统中药,为卫茅科雷公藤属植物,主要化学成分包括生物碱、贴类及色素剂。 THH在中医临床上,常用于治疗风湿性关节炎、红斑狼疮等自身免疫性疾病,由于发现 THH具有可逆性抗生育及抗肿瘤效应而引起人们的关注。有资料表明 THH有明显的细胞分裂抑制效应、非整倍体毒性和可能的染色体损伤作用,但关于 THH在基因水平上的影响作用还很少报道[1~4]。因此,本研究采用 HL-60细胞作为实验对象,观察 THH对 HPRT位点的影响作用,为探讨 THH的遗传毒性以及抗肿瘤作用的机制提供一定的材料与信息。

1 材料与方法

1.1 实验用细胞株

HL-60细胞,属人急性早幼粒白血病细胞株。细胞形态呈淋巴母细胞样,核型 46(43~ 48),倍增时间 12~ 16 h[5]。由本校营养卫生教研室张乾勇博士惠赠。细胞呈悬浮生长,接种 (1× 10^4细胞)于培养瓶中,每 2~ 3 d换液一次。实验前用 1% HAT培养基 (内含次黄嘌呤、氨基喋呤和胸腺嘧啶核苷)除去自发突变。

1.2 THH的制法

20 g THH根茎打碎成小颗粒,加入 400 ml双蒸水,浸泡过夜,煮沸 3次,每次 2~ 3 min,取上层液体浓缩成 30 ml,依次经过滤纸、 0.45μm、 0.22μm的滤膜过滤,4℃保存备用。

1.3 染毒与细胞毒性测定

将指数生长期的细胞弃去培养液,然后加入含不同浓度 THH的不完全培养液 (1.67、 5、 10、 20、 33.33μg生药/ml),染毒 6 h,以含一定体积双蒸水的有血清培养基作为阴性对照,以 50μg/ml ENU作为阳性对照 (染毒 4 h),停止染毒后用 D-Hanks液冲洗两次,更换正常的完全培养液。计数细胞,用完全培养液稀释后,接种于无菌 96孔培养板中,每孔约 1个细胞 (200μl),每板 79~ 89孔,置于 37℃, 5% CO_2培养箱中培养, 7 d后计数阳性孔数,求细胞接种存活率 (Plating efficiency, PE)。

$$PE=\frac{-\mathrm{Ln}(\text{阴性孔数}/\text{接种孔数})}{\text{每孔接种细胞数}}$$

1.4 表现型表达与突变频率的测定

取表达结束后 (8 d)的 HL-60细胞,计数稀释后,接种于无菌 96孔板中,每孔 1个细胞,培养 7 d后,计数阳性克隆孔,求出克隆形成率 (Cloning efficiency, CE)。

$$CE=\frac{-\mathrm{Ln}(\text{阴性孔数}/\text{接种总孔数})}{\text{每孔接种细胞数}}$$

同时以 1× 10^4个细胞/孔接种于 96孔板中,每孔 200μl筛选培养液,含 6-硫代鸟嘌呤 1μg/ml, 37℃、 5% CO_2培养 8 d,计数阳性孔数,求突变频率 (Mutation frequency, MF)。

$$MF=\frac{-\mathrm{Ln}(\text{阴性孔数}/\text{接种孔数})}{\text{每孔接种细胞数}\times CE}$$

2 结果

THH对人白血病细胞 HL-60的毒性作用见图 1。随着染毒剂量的加大,细胞存活率明显下降,数据经计算机曲线拟合,符合数学模型 $Y=96.3e^{-0.03X}$,可决系数 $R^2=0.972$,残差平方和 $SS_R=239.543$, $P<<0.01$,说明细胞存活率与染毒剂量有非常显著的线性相关。

THH诱发人白血病 HL-60细胞 HPRT位点突变频率见图 2。剂量在 0~ 20.1 mg/ml范围时,突变频率随着染毒剂量的加大而明显增加,数据采用计算机曲线拟合,符合以下数学模型 $Y=-3.34+0.76X$,可决系数 $R^2=0.891$,残差平方和 $SS_R=287.88$, $P<0.01$,说明突变频率与染毒剂量有非常显著的线性相关。但随着 THH的浓度增高至 33.33 mg/ml时,由于细胞存活率太低,达不到最后接种要求,不能继续进行。因此, THH的遗传毒性及致突变性并不是单纯遵循剂量越大,效应

* 刘胜学,男,29岁,助教,硕士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

越大这一简单的剂量反应关系,而只是在一定的剂量范围内遵循这一规律。

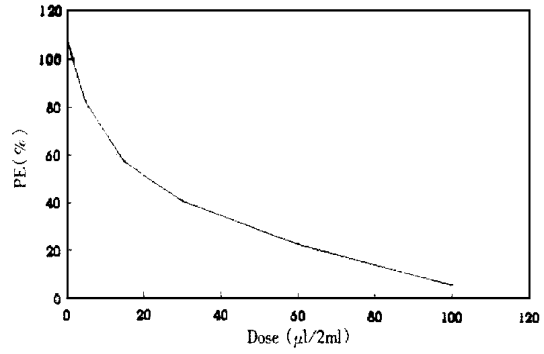


图 1 细胞接种存活率与 THH染毒剂量之间的关系

Fig 1 The relationship between plating efficiency and THH dose

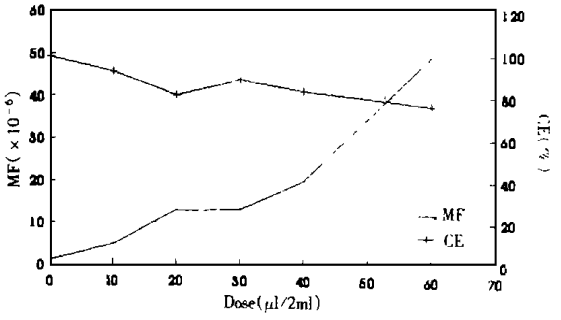


图 2 THH染毒剂量分别与细胞克隆效率、突变频率之间的关系

Fig 2 The relationship among cloning efficiency, mutation frequency and THH dose

3 讨论

人和啮齿类动物细胞的次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase, HPRT)位点的基因产物是 HPRT,该酶参与细胞内嘌呤核苷酸生物合成的补救途径,它可以一些嘌呤类似物如 6硫代鸟嘌呤、6巯基嘌呤及 8-氮鸟嘌呤为底物,生成核苷-5单磷酸,后者掺入到 DNA中将引起细胞死亡。因此,在含 6硫代鸟嘌呤的培养基中,HPRT位点突变的细胞可以生长,而未产生突变的细胞则不能存活[6]。本实验采用 HL-60细胞 HPRT位点正向突变试验检测到 THH的细胞毒性和致突变性,发现诱变细胞的克隆效率与突变频率呈反向关系,并得出了 THH的剂量与 HPRT基因突变频率的量效关系的数学模式,这一方面有利于对环境致突变剂生物危害的定量评价,另一方面使不同类型环境致突变剂生物危害效应的定量比较成为可能。

对 THH遗传毒性的研究国内外只有少量报道。汪旭等[2]经 Ames试验、人外周血淋巴细胞姐妹染色单体互换以及小鼠骨髓细胞染色体结构畸变分析,发现 THH的水提取物及乙醇提取物均有低度基因毒性效应,在对细菌无明显杀伤作用的剂量下都能诱发细菌靶基因发生碱基置换与移码突变。THH处理人外周血淋巴细胞后,诱发姐妹染色单体互换频率显著升高,同样表明基因毒性的存在。在对 THH诱发果蝇生殖细胞非整倍体的研究中发现,THH可在果蝇生殖细胞形成中导致染色体的丢失或不分离[1]。我室应用荧光原位杂交技术和抗着丝粒抗体间接免疫荧光染色技术对 THH诱导 NIH3T3细胞产生的微核进行了检测,结果表明,微核中有 62.1%~68.4%均带有标记上的着丝粒,显示其来源于染色体异常分离后丢失的整条染色体,也表明 THH有较强的非整倍体毒性[7]。在进一步研究 THH是否对染色体结构造成损伤中发现,THH在小鼠骨髓细胞染色体畸变分析中未表现出明显的染色体断裂效应,另在对 NIH3T3细胞的研究中也获得类似结果,仅高剂量组有染色体畸变,并提示结构畸变集中在"带着丝粒的断片"。THH较确切的非整倍体毒性和可能存在的染色体损伤作用,暗示 THH能对着丝粒蛋白的结构和功能造成一定损害[7]。

有报道指出,THH成分中的雷公藤素甲和乙对白血病模型 L_{1210}、P_{388}、L_{615}小鼠有明显的抗肿瘤活性,而且长期存活小鼠经数次攻击仍未导致白血病。雷公藤酮对体外培养的人鼻咽癌细胞 ED_{50}为(10^{-3}~10^{-4})μg/ml[4]。Kupchan[8]认为雷公藤素甲的作用原理是 9,11位环氧开环,使药物对生物大分子发挥选择性烷化剂作用。本实验采用人白血病 HL-60细胞获得的结果是否与 THH抗肿瘤性有关还不清楚。我们正在进一步采用多重 PCR技术,对突变克隆 DNA扩增其 HPRT位点的 9个外显子,以期明确突变发生的位置、性质,为进一步开发利用传统中药 THH提供有益的线索。

参考文献

1 汪 旭,合正基,刘素清.昆明山海棠诱发果蝇生殖细胞非整倍体的研究.遗传,1995,17(5):34

2 汪 旭,周汝敏,严 勇,等.昆明山海棠遗传毒性评价.遗传,1993,15(6):13

3 王士民,王 蔼,张珠涛,等.昆明山海棠对雄性大鼠的抗生育作用及其可逆性研究.中国药学杂志,1989,24(11):652

4 贾 力.雷公藤属植物的化学、药理和临床应用.药学通报,1985,20(2):101

5 Collins S T, Gallo R C, Gallagher R E. Continuous growth

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

and differentiation of human myeloid leukemic cells in suspension culture. Nature, 1977, 270(4837): 347
6 刘毓谷.卫生毒理学基础.第 2版.北京: 人民卫生出版社, 1994. 107~ 108
7 曹 佳,胡 斌,程天民,等.昆明山海棠在微核实验中非整倍体毒性的研究.遗传, 1997, 19(1): 1
8 Kupchan S M. Therapy of renal diseases and related disorder. Cancer Treat Rep, 1976, 60(8): 1115

(收稿: 1998-10-21;修回: 1998-12-09)
(编辑 刘 鹏)

Effects of Tripteryginm hypoglaucum hutch on HPRT gene of human promyelocytic leukemia cells

Liu Shengxue, Cao Jia, An Hui, Yang Mingjie, Ao Lin, Yang Lujun (Department of Molecular Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To investigate the effects of Tripteryginm hypoglaucum hutch (THH) on the HPRT gene of human promyelocytic leukemia cells. Methods: HL-60 cells were infected with TTH with different concentrations and put into single-cell wells at different time phases. Then the numbers of positive wells were counted and the cell plating efficiency, cloning efficiency and mutation frequency were determined. Results: When the concentration of THH was from 3.35 to 20.10 mg/ml, the cell mutation frequency was positively correlated to the concentration. When the concentration of THH rose up to 33.50 mg/ml, the experiment could not be continued because the cell plating efficiency was too low. This phenomenon might be related with the toxicity of the THH cells. Conclusion: THH can exert mutagenic effects on HPRT gene in HL-60 cells, but there is dose limit in dose-response relationship.

Key words THH; HPRT locus; mutagenesis; HL-60 cell

低压缺氧对大鼠学习记忆及海马 GABA含量的影响

Effects of altitude hypoxia on learning, memory and GABA content of hippocampus in rats

张金海* 阮怀珍 袁碧波 吴喜贵 范晓棠 (第三军医大学基础医学部神经生物学教研室) 重庆, 400038

在机体的所有器官中,中枢神经系统对低氧最敏感,低氧可引起脑功能障碍,如记忆、行为、情绪等高级功能障碍,但机制尚不清楚。为此,本实验利用低压缺氧模型,探讨大鼠学习记忆行为的改变以及与海马 GABA含量的关系。

1 材料和方法

1.1 动物及模型

Wistar大鼠 36只,雌雄不拘。实验分为低氧组(18只):将大鼠置于模拟海拔 6 000 m的低压舱内(4℃),每天 8 h,连续 15 d, 10只进行爬杆主动回避训练(常氧条件), 8只进行 GABA测定。对照组(18只):正常饲养(室温 24℃,常氧), 10只进行爬杆主动回避训练, 8只进行 GABA测定。

1.2 爬杆主动回避反应

按文献[1]进行大鼠自动爬杆主动回避反应(Active avoidance reaction, AAR)训练。以正确反应率连续 3 d都在 80%以上为习得标准。习得以后观察不同时间 AAR正确率的变化,为爬杆反应的保持率。

1.3 GABA的提取和测定

大鼠断头,迅速取出海马,精确称重。置样品于冰镇玻管中,加入 10%磺基水杨酸(1 ml),冰浴下以玻璃匀浆器手动匀浆并离心,取上清液 50μl,用高效氨基酸分析仪检测 GABA含量。

2 结果

2.1 低压缺氧对大鼠 AAR的影响

正常对照组大鼠在 AAR习得训练中,随着训练天数的增多, AAR习得率逐渐增高,训练的第 5天, AAR习得率已超过 80%,而低压缺氧大鼠不到 50%,且每天均低于对照组。在两组分别达到习得标准后,进行 AAR保持测试,结果,低压缺氧组的 AAR保持率明显低于对照组,见表 1

(下转 118页)

* 张金海,男, 31岁,助理实验师

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net