白术提取物对六价铬致人外周血淋巴细胞 抗突变作用研究

黄清松 李红枝 张咏莉 丘淑玲
(广东药学院生物学教研室 广东 广州 510006)

摘要 目的:探讨白术提取物抗六价铬的致突变作用。方法:采用人外周血淋巴细胞程序外 DNA 合成(UDS)试验检测了 0.03g、0.015g 和 0.0075/ml 白术提取物对重铬酸钾(含 Cr^{6+} 0.31ug/ml)所致淋巴细胞程序外 DNA 合成的影响。同时检测白术提取物与重铬酸钾的加入顺序对 UDS 的影响。结果:阳性对照(重铬酸钾,含 Cr^{6+} 0.31ug/ml)组 CPM 值显著高于阴性对照(蒸馏水)组, $P < 0.01$ 。白术提取物与重铬酸钾同时加入以及两者间隔 2h 先后加入均显示白术提取物浓度与 CPM 值呈显著负相关($P < 0.05$),在上述不同加入方法中,白术提取物的各浓度均显示 CPM 值显著低于阳性对照。结论:白术提取物具有抑制 Cr^{6+} 的致突变作用。

关键词:白术;程序外 DNA 合成;致突变;拮抗剂;淋巴细胞

中图分类号:R285 **文献标识码:**

The research on the effect of abstraction of Atractylodes on the ability of resisting mutation of human peripheral blood lymphocytes for Cr^{6+}

HUANG Qing - song, LI Hong - zhi, ZHANG Yong - li, QIU Shu - ling

(Department of Biology, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, Guangdong, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of abstraction of Atractylodes on the ability of resisting mutation of Cr^{6+} . **Methods:** The test of UDS(unscheduled DNA synthesis) was used to detect the effect of Atractylodes (0.03g/ml, 0.015g/ml and 0.0075g/ml respectively) on the composition of DNA around the lymphocytes induced by Potassium dichromate (Cr^{6+} 0.31ug/ml) as well as the abstraction of Atractylodes and the adding sequence of Potassium dichromate. **Results:** The value of CPM in the group of positive contrast (Potassium dichromate, Cr^{6+} 0.31ug/ml) was higher than that in the group of negative contrast distilled water($P < 0.01$). It has been displayed that the density of abstraction of Atractylodes has negative correlation with the value of CPM by adding the abstraction of Atractylodes and Potassium dichromate at the same time and adding them with the interval of 2 hours. In the aboved different adding ways, the density of abstraction of Atractylodes displays the value of CPM is obviously lower than the positive contrast. **Conclusion:** The abstraction of Atractylodes has the ability of suppressing the mutation of Cr^{6+} .

Key words: Atractylodes; Unscheduled DNA synthesis (UDS); Mutagenicity; Aantagonist; Lymphocytes

白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* koidz 的干燥根茎,具有健脾益气,燥湿利水,用于脾实气少,腹胀泄泻,痰饮眩悸,水肿,自汗,胎动不安^[1],是临床常用中药,其中 1990 年版中国药典总共收载白术的方剂就有 37 首,是高配方频度中药之一。目前研究发现,促进单核-巨噬细胞系统功能增强或细胞数量增多的中草药中就有白术^[2]。白术中含有白术多糖、白术挥发油等化学成分,其中白术多糖是主要的免疫活性成分^[3,4]。六价铬是环境中常见的污染物之一,遗传毒性研究表明对人体和动物具有致突变性和致癌性。本文通过程序外 DNA 合成(UDS)试验了解白术提取物抑制六价铬对 DNA 的损伤作用,进一步深入探讨其抗突变作用及其机制,以期有更广泛的开发利用价值。

1 材料和方法

1.1 白术提取物

白术干品购自广州市药材公司。称取 3.0g 白术,用甲醇浸泡提取,60℃ 水浴挥发甲醇,残留物用双蒸水溶解,定容到 100ml,即 0.03g/ml(高浓度),依次等比稀释到 0.015g/ml(中浓度)和 0.0075g/ml(低浓度)。

1.2 重铬酸钾($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$)

济南试剂总厂产品,分析纯,配成铬浓度为 0.31 ug/ml 溶液。

1.3 全营养液

RPM1640,由美国 Life Technology Ine Grand Island NY 生产,净重 10.4g,溶于双蒸水,定容到 1000ml,使用前过滤除菌。每 100ml 全营养液含青链霉素各 1 万 U,20ml 小牛血清,其 pH 值调整为 7.2。

1.4 Hands 液

称取 NaCl 16.00g, KCl 0.8g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.25g,葡萄糖 2.0g,用蒸馏水溶解,加入 0.4% 酚红,10.0ml 氯仿 0.8ml,

作者简介:黄清松,(1966-)男,本科。实验师

主要研究方向:细胞生物学与遗传毒理学。

联系电话:13728023322。E-mail: xiaoxiaozi18@163.com。

(收稿日期:2006-05-16 接受日期:2006-06-10)

定容到 500ml 待用。

1.5 羟基服

济南制药厂生产,使其成为试验所需浓度 10mmol/L。

1.6 闪烁液的配制

二甲苯 200ml, 2, 5- 二甲基恶唑(PPO) 1g, 1, 4- 双- [5- 苯基恶唑基- 2] 苯(popop) 0. 1g, 加入 50ml 无水乙醇配成。

1.7 UDS 试验方法

1.7.1 采血: 每管加抗凝血、生理盐水各 5ml 混匀。

1.7.2 分离淋巴细胞: 取 4 支离心管, 每管加入淋巴细胞分离液 2. 5ml, 沿试管壁小心加入稀释全血 5ml 至分离液上层, 以 3000r/min 的速度离心 30min, 管内液体分为 5 层, 小心吸取淋巴细胞层于 10ml Hanks 液中, 打匀, 以 1500r/min 的速度离心 10min, 弃去上清液。根据估算加入含 20% 小牛血清的 RPMI640 培养液配成细胞浓度为 2×10^6 个细胞/ml 的细胞悬液, 放入 37℃ 培养箱内备用。

1.7.3 分组: 将细胞悬液 0. 5ml 加入康氏管, 同时加入羟基服 3H- tdR0. 2ml, 混匀。A 组按不同浓度每管加入白术提取物 1ml 和 Cr^{6+} 1ml, B 组按不同浓度加入白术提取物 1ml, C 组加入 Cr^{6+} 1ml, 时, 其中 Cr^{6+} 为阳性对照, 蒸馏水为阴性对照。将 11 个样品管置 37℃ 温箱中孵育, 2h 后, 取出 B 组样品管, 每管加入 Cr^{6+} 1ml。取出 C 组样品管, 每管按不同浓度加入白术提取物 1ml 时, 继续放入 37℃ 温箱中孵育, 2h 后取出, 终止反应。

1.7.4 样品制备及液闪测定: 通过滤膜过滤细胞, 依次用双蒸水 200ml, 5% 三氯乙酸 5ml, 甲醇 10ml, 过滤进行洗涤与固定, 然后在 60℃ 将滤膜烘干, 放入 5ml 闪烁液于闪烁瓶内, 用液闪计数仪测定 CPM 值。

2 结果

2.1 不同浓度白术提取物对 Cr^{6+} 的抗突变作用

表 1 可见, 不同浓度白术提取物均有不同程度地降低 CPM 值的作用, 与阳性对照组比较, 有显著差异 ($P < 0. 01$), 说明不同浓度的白术提取物均有对抗 Cr^{6+} 的致突变作用。同时也观察到, 白术和重铬酸钾加入次序不同, 其 CPM 值也不同。

2.2 白术提取物对抗 Cr^{6+} 的致突变作用的剂量- 效应关系

表 1 可见, 以浓度为自变量, 以 CPM 值为因变量, A、B、C 组对 Cr^{6+} 的致突变作用均有明显的剂量- 效应关系 ($P < 0. 05$), 反映了以上白术提取物确有抗突变作用。

表 1 不同浓度白术提取物对 Cr^{6+} UDS 试验的 CPM 值(次数 /min)

Tab 1 The effect of abstraction of Atractylodes to unscheduled DNA synthesis (UDS) for Cr^{6+} (times/min)

浓度(g/ml)	A 组	B 组	C 组
0. 0075	491	811	502
0. 015	433	773	476
0. 030	331	715	369
P	< 0. 05	< 0. 05	< 0. 05

注: 阳性对照 Cr^{6+} CPM: 261 /min; 阴性对照(蒸馏水) CPM: 295/min;

与阳性对照比较 $P < 0. 011$

3 讨论

白术是常用的补气药, 具有补气健脾, 固表止汗的功能, 也是肿瘤病人常用调理的药物。近年来, 白术的抗突变作用已有所探索, 白术具有较强的抑制 4 种靶细胞 DNA 合成的作用。研究表明, 铬及其化合物对人和动物具有致癌性^[5, 6]。铬化合物在细胞水平的诱变性和细胞对铬的生物利用有关, 铬在化合物中的价态和铬化合物的溶角度是决定细胞生物利用的两个主要因素。易溶和可溶性 Cr^{6+} 化合物多具诱变性, Cr^{6+} 诱发 DNA 损伤包括 DNA 单链断裂, DNA- 蛋白质交链和 Cr - DNA 化合物的形成, 同时 Cr^{6+} 还可阻止 DNA 的修复。本试验结果表明, 白术提取物对 Cr^{6+} 的致突变作用有明显的抑制, 抑制作用随白术提取物浓度的增高而越来越明显, 并呈剂量- 效应关系。在体外试验中, 阳性物和受试物先后加入, 或者同时加入, 均表现出受试物的显著抗突变作用。作用机理可能是六价铬化合物从细胞外进入细胞内, 并由六价铬转为三价铬是一个较为复杂的过程, 而受试物进入胞内过程迅速, 起着显著的抑制作用; 六价铬产生的遗传毒性效应在尚未完全稳定时, 受试物进入后可以直接或间接对染色体起保护作用或者形成修复功能。为进一步研究白术的抗突变作用, 我们还需要了解白术提取物的具体抗突变成分和抗突变原理。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典[M]. 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 北京: 人民卫生出版社, 化学工业出版社出版. 1990 年 1 部: 84- 85
- [2] 彭新国, 邱世华. 白术对小鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(5): 396- 397
- [3] 高丽松, 周海英, 曾凡潘, 等. 磁处理白术药液对小白鼠免疫器官指数影响的药效研究[J]. 生物磁学, 2004, 4(3): 9- 11
- [4] 高丽松, 曾凡潘, 黄锦微, 等. 磁处理白术药液对消化功能影响的药效研究[J]. 生物磁学, 2004, 4(2): 4- 6
- [5] 张忠义, 刚葆琪. 铬及其化合物的遗传毒性研究进展[J]. 工业卫生与职业病, 1995, 21(4): 245
- [6] 贾义, 刘世杰, 赵修南. 一定剂量 Cr^{6+} 可诱导细胞出现凋亡[J]. 卫生毒理学杂志, 1997, 11(1): 63