

组织中的 PCNA 呈阳性的肿瘤细胞显著低于模型组,表明肿瘤增殖受到了抑制。同时,阿魏酸钠组比模型组微血管计数显著减少,说明阿魏酸钠抑制了小鼠体内 H_{22} 肿瘤的生长和血管生成。但是,本实验并不能证实白芍总苷具有抑制肿瘤生长及肿瘤血管生成的作用,但也没有证据表明白芍总苷有促进肿瘤生长的作用。

为了进一步分析阿魏酸钠抑制血管生成的作用是否通过对 H_{22} 肿瘤细胞的直接细胞毒作用而实现的,采用 MTT 法来验证阿魏酸钠是否对体外培养的 H_{22} 肿瘤细胞具有直接的细胞毒作用。结果阿魏酸钠组的质量浓度即使达到了 $160 \mu\text{g/mL}$,其肿瘤细胞的 A 值尚与模型组无显著性差异。说明阿魏酸钠对肿瘤细胞不具有直接的细胞毒作用,阿魏酸钠对整体动物肿瘤模型的肿瘤生长抑制作用是通过抑制肿瘤血管生成实现的。

免疫组织化学发现,阿魏酸钠各剂量组均能有效地抑制肿瘤组织的 VEGF 表达。VEGF 是最重要的促血管生成因子,能通过其受体 KDR/Flk-1 有效激活胞外信号调节激酶 (ERK),从而刺激内皮细胞 DNA 合成^[9],也能够通过 PI-3K 通路激活抗凋亡激酶 Akt/PKB 而发挥抗凋亡作用^[10]。结合阿魏酸钠组肿瘤组织微血管密度降低的结果,说明阿魏酸钠可能是通过抑制肿瘤细胞 VEGF 的分泌来抑制体内 H_{22} 肿瘤的生长及血管生成。

References:

[1] Xu X Y, Wang S M, Chen W H, et al. Effect of Taohong

- Siwu Decoction I on inhibiting the angiogenesis and KDR/FLK-1 expression [J]. *New Clin Pharmacol Tradit Chin Med* (中药新药与临床药理), 2005, 9(16): 329-332.
- [2] Chen G, Xu X Y, Yun P K, et al. Relationship between effect of tetramethylpyrazine and Danshen on inhibiting Lewis lung carcinoma growth and tumor angiogenesis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(3): 296-299.
- [3] Zhu X Q, Zhang X J. Inhibitory effects of sodium ferulate on human EBL-7040 hepatocellular carcinoma cells [J]. *Chin J Hepatol* (中华肝脏病杂志), 2001, 6(1): 19-20.
- [4] Ruggeri B, Singh J, Gingrich D. CEP-7055: A novel orally active pan inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases with potent antiangiogenic activity and antitumor efficacy in preclinical models [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(17): 5559-5563.
- [5] Kitadai Y, Haruma K, Tokutomi T, et al. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor in human esophageal carcinomas [J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4(9): 2095-2200.
- [6] Oehler M K, Bicknell R. The promise of anti-angiogenic cancer therapy [J]. *B J Cancer*, 2000, 82(4): 2749-2750.
- [7] Feng J D, Xu X Y. Inhibition of tetramethylpyrazine-containing serum on proliferation of human liver cancer Hep G₂ [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(4): 231-233.
- [8] Xu X Y, Yang L R, Chen G. The effect of tetramethylpyrazine on proliferation of ECV304 [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(10): 1150-1152.
- [9] Avraham H K, Lee T H, Koh Y, et al. Vascular endothelial growth factor regulates focal adhesion assembly in human brain microvascular endothelial cells through activation of the focal adhesion kinase and related adhesion focal tyrosine kinase [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(38): 36661-36668.
- [10] Thakker G D, Hajjar D P, Muller W A, et al. The role of phosphatidylinositol 3'-kinase in vascular endothelial growth factor signaling [J]. *J Biol Chem*, 1992, 274(15): 10002-10007.

槟榔碱对骨髓细胞内 DNA 的影响

季宇彬, 李连闯, 于 蕾

(哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 通过体内骨髓细胞实验,探讨槟榔碱对 DNA 的损伤作用机制。方法 采用 AO 探针标记,激光共聚焦技术检测槟榔碱对骨髓细胞内 DNA 和 RNA 的影响;采用流式细胞仪测定槟榔碱对骨髓细胞周期的影响。结果 给予槟榔碱 20、10、5 mg/kg 剂量的染毒组,骨髓细胞内 RNA/DNA 的荧光像素比值明显高于空白对照组,差异非常显著 ($P < 0.01$);骨髓细胞周期与空白对照组相比, G_0/G_1 期细胞比率有非常显著增加 ($P < 0.01$),S 期细胞比率有非常显著降低 ($P < 0.01$), G_2/M 期细胞比率有非常显著降低 ($P < 0.01$)。结论 槟榔碱对小鼠骨髓细胞的 DNA 有一定的损伤作用,具有一定的遗传毒性。

关键词: 槟榔碱; 激光共聚焦; 流式细胞仪; DNA; RNA; 细胞周期

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)04-0573-03

收稿日期: 2006-10-30

作者简介: 季宇彬(1956—),男,辽宁省人,教授,博士,多年来一直致力于中药药理、肿瘤药理、分子药理学研究。

Effects of arecoline on DNA in bone marrow cells

JI Yu-bin, LI Lian-chuang, YU Lei

(Research Center on Life Sciences and Environmental Science, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: Objective To study the mechanism of arecoline on damage to DNA through the bone marrow cell experiment *in vivo*. **Methods** Laser Confocal Microscope was adopted to measure DNA and RNA of the bone marrow cells marked by AO probe. Influences of arecoline on cell cycle were observed by the Flow Cytometer. **Results** Injection of arecoline to 20, 10, and 5 mg/kg posologic group, the fluorescence pixel ratio apparently higher than that in blank control group of the bone marrow cell inside RNA/DAN, the difference was significant ($P < 0.01$). Bone marrow cell cycle by comparison to blank control group, G_0/G_1 per cell ratio had got particularly increase ($P < 0.01$), S per cell ratio had got particularly decrease ($P < 0.01$), and G_2/M per cell ratio also had decreased obviously ($P < 0.01$). **Conclusion** The arecoline have got definite damage action on DNA in bone marrow cell of mice and possessed some genetic toxicity.

Key words: arecoline; laser confocal microscope; Flow Cytometer; DNA; RNA; cell cycle

咀嚼槟榔习惯与口腔黏膜下纤维性变的发生密切相关,有实验研究表明,用槟榔制剂涂在大鼠的口腔黏膜上,88% 的实验鼠均发现口腔黏膜下纤维性变,且有恶变倾向。由此可见,嚼食槟榔危害健康,尤其是可增加罹患口腔癌的危险。用槟榔水提取物给大鼠 sc,全部动物都发生恶性纤维间质瘤,因而认为槟榔碱的水解物可能是致癌物质。自槟榔中分离出的生物碱以槟榔碱的量最多,是槟榔的主要成分,有毒性。此外,尚含有少量槟榔次碱和去甲基槟榔次碱及更少的去甲基槟榔碱、槟榔副碱和异去甲基槟榔次碱等^[1]。槟榔碱为无旋光性、无色油状液体,无臭,味苦,其性质不稳定,具有挥发性,常制成槟榔碱的氢溴酸盐或无机盐,是一种 M、N 受体激动剂。药理毒理试验证实,槟榔碱有 M-胆碱反应和拟副交感神经毒理作用等几种毒副反应,并较毛果芸香碱、毒扁豆碱及蝇蕈为强。在前期实验中发现,槟榔碱有致微核突变和染色体畸变的作用,本实验研究旨在探讨槟榔碱对 DNA 的损伤作用机制。

1 材料

1.1 药品和试剂:氢溴酸槟榔碱(质量分数 98%),购于中国药品生物制品检定所;荧光探针为 0.01% 的吖啶橙(AO),购于 Sigma 公司;PI, Sigma P4170;PBS、TritonX-100,武汉博士德生物工程有限公司;Rnaes, Sigma R4875。

1.2 主要仪器:SP-2 激光扫描共聚焦显微镜,Leica;流式细胞仪,Beckman-Coulter 公司;CO₂ 培养箱,三洋公司;LD₄-2A 型台式低速离心机,北京医用离心机厂;Sartorius BS110S 型万分之一电子天平,德国。

2 实验方法

2.1 实验动物的分组及染毒:小鼠 40 只,随机分成 4 组,每组 10 只,雌雄各半,采用 ip 给药对小鼠进行染毒,各组染毒剂量分别为 20、10、5 mg/kg (相当于 1/4 LD₅₀、1/8 LD₅₀、1/16 LD₅₀),另设空白对照组(生理盐水)。槟榔碱不同剂量染毒组连续染毒 14 d,每天上午 9 点 ip 一次。实验组于末次染毒后禁食、自由饮水,24 h 内进行实验。

2.2 激光扫描共聚焦显微镜测定槟榔碱对骨髓细胞内 DNA、RNA 的影响:取小鼠股骨的骨髓细胞,滤过,离心,制备人工贴壁细胞,采用荧光探针 AO 染色,置激光扫描共聚焦显微镜上观察,使用 488 nm 氩离子激光激发荧光染料 AO^[2]。每张标本,选取 10 个细胞,激光扫描共聚焦自动处理得出 RNA/DNA 的荧光像素比值,做统计学处理。

2.3 流式细胞仪测定槟榔碱对骨髓细胞周期的影响:取小鼠股骨的骨髓细胞,滤过,离心,制备细胞悬液,PI 染色,用流式细胞仪测定骨髓细胞周期,激发光波长为 488 nm,发射光波长大于 630 nm。每份样品选取 10 000 个细胞,做统计学处理。

2.4 数据处理:对所有数据进行方差分析,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 激光扫描共聚焦显微镜测定槟榔碱对骨髓细胞内 DNA、RNA 的影响:结果表明(表 1),给予槟榔碱 20、10、5 mg/kg 剂量的染毒组 RNA/DNA 的荧光像素比值明显高于空白对照组,差异非常显著($P < 0.01$)。激光共聚焦扫描图像观察,细胞核内 DNA 呈绿色荧光,细胞内 RNA 呈红色荧光,染毒后 RNA 荧光强度明显增强,而 DNA 荧光强度明显降低。用激光扫描共聚焦显微镜重建骨髓细胞的

扫描图可以明显显示出这种差异。

3.2 流式细胞仪测定槟榔碱对骨髓细胞周期的影响: 结果表明 (表 2), 给予槟榔碱 20、10、5 mg/kg 剂量的染毒组小鼠骨髓细胞周期与空白对照组相比, G_0/G_1 期细胞比率非常显著增加 ($P < 0.01$), S 期细胞比率非常显著降低 ($P < 0.01$), G_2/M 期细胞比率非常显著降低 ($P < 0.01$)。

表 1 槟榔碱对小鼠骨髓细胞内 DNA 和 RNA 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of arecoline on DNA and RNA in bone marrow cells of mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	动物/ 只	细胞数/ 个	RNA 与 DNA 的 荧光像素比值
空白对照	—	10	100	0.72 ± 0.09
槟榔碱	5	10	100	0.84 ± 0.59**
	10	10	100	0.92 ± 0.09**
	20	10	100	0.97 ± 0.07**

与空白对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs blank control group

表 2 槟榔碱对骨髓细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of arecoline on cell cycle in bone marrow cells of mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	细胞数/ 个	细胞周期/%		
			G_0/G_1	S	G_2/M
空白对照	—	10 000	65.18 ± 1.01	27.11 ± 1.99	7.71 ± 1.08
槟榔碱	5	10 000	75.30 ± 1.57**	20.87 ± 1.88**	3.83 ± 0.36**
	10	10 000	85.50 ± 1.45**	10.50 ± 1.68**	3.99 ± 0.89**
	20	10 000	87.25 ± 1.49**	9.91 ± 0.64**	2.84 ± 0.50**

与空白对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs blank control group

4 讨论

激光共聚焦扫描显微镜是利用荧光探针渗透到细胞内部, 有选择地与活细胞的不同成分结合; 以激光共聚焦扫描细胞; 使用计算机对获得的细胞荧光强度进行量和形态的分析, 不仅能得到较光学显微镜分辨率高的细胞形态和组分分布的清晰图像, 而且可动态观察细胞内代谢的变化^[3]。本实验所采用的荧光探针为 AO, 它可以在使用某一浓度时对活细胞进行染色。一般使用的浓度介于 1:10 000 和 1:500, 本研究使用的浓度为 1:10 000。AO 染料具有可以被可见光激发及激光淬灭率低的特点。本实验通过激光共聚焦扫描显微镜扫描结果, 可以观察到 ip 槟榔碱染毒两周后, 随着染毒剂量的增加, 20、10、5 mg/kg 染毒剂量组的 RNA 与 DNA 比值与空白对照组相比均有显著上升, RNA 的量明显增加, DNA 的量明显降低, 提示可能是槟榔碱干扰 DNA 的模板功能, 与 DNA 共价结合引起复制期间核苷酸错配, 或是与 DNA 发生交联, 还可能是引起

DNA 断裂, 从而阻断 DNA 复制, RNA 与 DNA 的荧光像素比值明显高于空白对照组 ($P < 0.01$), 证明槟榔碱对小鼠骨髓细胞内 DNA 和 RNA 的量有明显的影 响, 提示槟榔碱对 DNA 合成有一定的抑制作用。

细胞周期检测是研究外来化合物致毒作用机制的重要手段, 流式细胞术是细胞周期检测最有效的常用方法^[4]。细胞周期有两个主要限制点, 即 G_1/S 限制点 (控制细胞从 G_1 期进入 S 期, 能防止受损的碱基复制, 修复染色体中的突变) 和 G_2/M 限制点 (被“细胞”一分为二的控制点, 能使细胞在进入分裂期之前修复已复制好的 DNA 上出现的损伤)。通过限制点后, 刺激信号被去除, 细胞仍然会开始 DNA 复制^[5]。本实验将小鼠骨髓细胞作为研究对象, 利用流式细胞仪, 对其细胞周期做了研究。20、10、5 mg/kg 染毒剂量组染毒后的小鼠骨髓细胞在 G_1 期细胞比率有非常显著增加 ($P < 0.01$), G_2/M 期细胞比率有非常显著降低 ($P < 0.01$), 说明槟榔碱可使骨髓细胞增长阻滞在 G_1 期, 影响 S 期 DNA 的合成, 从而减少进入 G_2/M 期细胞数。进入 S 期细胞的减少会使有丝分裂和细胞增殖数量降低, 表明槟榔碱已经对小鼠骨髓细胞的增殖能力造成抑制作用。骨髓细胞周期也是反映造血系统造血功能的重要指标, 细胞周期的分布情况可反映骨髓增生程度^[6]。本实验中骨髓细胞在 G_1 期发生阻滞, 而骨髓细胞周期发生 G_1 期阻滞是机体对外界刺激的一个保护性反应, 可提供充足的时间来促使受损伤 DNA 的合成和复制并于 S 期前得以修复。综上所述, 槟榔碱对小鼠骨髓细胞的 DNA 有一定的损伤作用, 具有一定的遗传毒性。

References:

- [1] Lin L, Ling T Y. The effect of oral submucous fibrosis and canceration pathogenesis on arecoline [J]. *J Clin Stomatol* (临床口腔医学杂志), 2006, 22(2): 124-126.
- [2] Yi Y B, Lang L, Jiang H. The effect of mouse marrow cell on TDI [J]. *J Toxicol* (毒理学杂志), 2006, 20(1): 38-39.
- [3] Li N, Wang L M, Yang J. The theory and application of laser scanning confocal microtechnic [J]. *Acta J PLA Postgrad Med School* (军医进修学院学报), 1996, 17(3): 232.
- [4] Islam Z, King L F, Fraker P J, et al. Differential induction of glucocorticoid7 dependent apoptosis in murine lymphoid subpopulations *in vivo* following coexposure to lipopolysaccharide and vomitoxin (deoxynivalenol) [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003, 187(2): 69-79.
- [5] Wang A P. The Principle of procreation toxicity experiment [J]. *Cancerat Deform Mutat*, 1999, 11(5): 260-261.
- [6] Yi Z N. To observe both astragali and arsenic trioxide with dose decrease arsenic trioxide effect of rat hemocyte and marrow cell [J]. *J Guangdong Med Coll* (广东医学院学报), 2004, 22(2): 109-111.