

单细胞凝胶电泳分析地黄提取物对仓鼠肺成纤维细胞 DNA 的损伤作用

姜 凌, 傅 鹏, 张建军, 申秀萍*

天津药物研究院 新药评价中心, 天津 300193

摘要: **目的** 采用单细胞凝胶电泳(彗星实验)技术研究地黄提取物致仓鼠肺成纤维细胞(CHL 细胞)DNA 的损伤作用, 为该药物临床前安全性评价提供参考。**方法** 采用 0.2、1.0、5.0 mg/mL 地黄提取物, 用双氧水作为阳性对照药, 处理细胞, 24 h 后收获细胞, 进行彗星电泳实验。**结果** 双氧水处理后造成 CHL 细胞产生明显的 DNA 损伤, 呈现不同彗尾长度的彗星, 与阴性对照组比较有显著差异。不同质量浓度的地黄提取物处理细胞后, 彗星长、彗尾长度等各项指标与阴性对照组比较无显著差异。**结论** 单细胞凝胶电泳检测 DNA 损伤的敏感度较高, 不同质量浓度的地黄提取物对 CHL 细胞未产生 DNA 损伤。

关键词: 地黄; 单细胞凝胶电泳; 彗星实验; DNA 损伤; 肺成纤维细胞; 双氧水

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2011)01-0026-03

Analysis on DNA damage of Chinese hamster lung fibroblasts cell line induced by *Rehmanniae Radix* extract with single cell gel electrophoresis

JIANG Ling, FU Peng, ZHANG Jiang-jun, SHEN Xiu-ping

Center for New Drug Safety Evaluation and Research, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To study the DNA damage of Chinese hamster lung (CHL) fibroblasts cell line induced by *Rehmanniae Radix* extract using single cell gel electrophoresis (SCGE) (comet assay) so as to provide the reference for preclinical safety evaluation of the drug. **Methods** Taking H₂O₂ as positive drug, the cells were treated with *Rehmanniae Radix* extract at the concentrations of 0.2, 1.0, and 5.0 mg/mL, respectively for 24 h, then the comet assays were performed. **Results** The obvious damage of CHL cells was induced by H₂O₂ and the significant difference was indicated by the the average tail length of comet in compared with the negative control group. There was no significant difference of every index, such as comet length and comet tail length at various concentrations of *Rehmanniae Radix* extract. **Conclusion** The comet assay shows considerable sensitivity to detect the lesion process. Different concentrations of *Rehmanniae Radix* extract could not induce DNA damage to CHL cells.

Key words: *Rehmanniae Radix*; single cell gel electrophoresis (SCGE); comet assay; DNA damage; CHL cell; H₂O₂

单细胞凝胶电泳(single cell gel electrophoresis, SCGE)又称彗星实验(comet assay),是一种检测单个细胞 DNA 断裂的技术^[1-2],因为被破坏的 DNA 在电场力作用下移动后形似彗星,所以称为彗星分析法,此方法已被证实是最具敏感性和快速性的方法。自 1984 年由 Ostling 等^[3]首先提出,后经 Olive 等^[4]的改进后形成现在完善的检测方法,广泛地应用于 DNA 放射损伤、DNA 剪切损伤、DNA 交联的检测、药物的毒性评价、细胞凋亡鉴定等工作中^[5-8]。近年来,越来越多的毒理研究者应用此方法,在体内、外对细胞进行 DNA 损伤诱导,以探讨已知遗传毒物和诱变剂的特异活性。

地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根,始载于《神农本草经》,具有调节免疫系统、抗肿瘤及调节血糖等诸多药理学功效。本实验采用单细胞凝胶电泳技术研究地黄提取物对仓鼠肺成纤维细胞 DNA 的损伤作用,为该药物临床前安全性评价提供参考资料。

1 材料和方法

1.1 主要材料

1.1.1 实验用细胞 仓鼠肺成纤维细胞 购自中国科学院细胞库,采用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,于 37 °C、5% CO₂ 培养。

1.1.2 主要试剂 RPMI1640 细胞培养基(Gibco

收稿日期: 2010-08-24

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划课题(2007BAI37B06)

*通讯作者 申秀萍,女,研究员,主要研究方向为临床前药理毒理及药理学。Tel: (022)23006951 E-mail: shenxp@tjipr.com

公司, 批号 1342878); 胰蛋白酶 (Gibco 公司, 批号 G-0013); 胎牛血清 (天津联星生物技术有限公司, 批号 2008100190); 彗星实验试剂盒 (耀明前沿科技发展中心, 批号 20090320)。

1.1.3 受试药物 地黄提取物, 由天津药物研究院新药评价中心提供。

1.1.4 仪器 MCO—19AIC 恒温 CO₂ 培养箱 (三洋电机国际贸易有限公司); IMT—2 倒置显微镜 (日本奥林巴斯光学工业株式会社); SHHW21 恒温水浴仪 (天津泰斯特仪器有限公司); DYY—11B 型三恒电泳仪 (北京市六一仪器厂); DYY—III 型电泳槽 (北京市六一仪器厂); DM LB2 型荧光显微镜; 1/4 英寸 CCD 400 万像素 (Canon) (德国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞染毒 用 0.25% 胰酶溶液消化传代细胞, 制备成 (3~5) × 10⁴/mL 细胞悬液, 取 2 mL 接种于培养瓶中, 加入 8 mL 新鲜培养液, 培养 2~3 d, 更换培养液, 加入 0.2、1.0、5.0 mg/mL 地黄提取物。培养 24 h 收获细胞。用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 移至离心管, 1 000 r/min 离心 10 min, 去上清液, 即得细胞悬液。

1.2.2 SCGE 实验条件 SCGE 实验条件参照试剂盒方法进行。取 10 μL 细胞加入 1% 低熔点琼脂糖 (LMA) 90 μL, 混匀后作为第 2 层铺在载玻片上 (已经铺第 1 层胶), 立即盖上盖玻片, 置 4 °C 固化 5 min, 移去盖玻片后将载玻片浸没于裂解液, 4 °C 下避光裂解 1.5 h。从裂解液中取出载玻片, 在蒸馏

水中漂洗后置于水平电泳槽中, 倒入电泳缓冲液使液面高于载玻片 2 mm, 避光解旋 30 min。调节电压为 25 V, 电流 300 mA, 室温下电泳 30 min。电泳完毕, 取出载玻片, 用中和缓冲液漂洗, 用冷存乙醇脱水 10 min, 常温放置。

1.2.3 染色、阅片及数据处理 50 μg/mL 溴化乙锭 60 μL 染色 20 min, 40×10 倍成像。以 100 W 汞灯作为荧光光源, 在激发波长 549 nm、发射波长 590 nm 的荧光显微镜下, 每片随机观察计数细胞 50 个, 用 Leica 图像分析仪观察和测量肺细胞 DNA 迁移距离。通过 CCD 及软件拍照, 进而测量并统计彗尾长度, 每个剂量组统计 50 个细胞。以彗星长、尾长、Olive 尾矩、尾 DNA 率、尾长与头长比 (尾/头) 作为主要分析指标。用 SPSS 软件对结果进行统计学分析。

2 结果

制备好的凝胶片在荧光显微镜下观察, 可见 DNA 被 EB 染成红色, 没有发生 DNA 断裂的细胞表现为一圆形类核, 即彗星头部, 荧光强度均匀, 边缘整齐; 而发生 DNA 断裂的细胞则表现为断片向阳极方向迁移, 形成彗星样的拖尾。双氧水作用后的细胞呈现明显的慧尾, 各分析指标与对照组比较均有显著差异 (P<0.05, P<0.01)。而各地黄提取物自染毒后细胞的各项分析指标与对照组比较均无显著差异, 说明在该实验条件下, 不同质量浓度的地黄提取物对细胞未产生毒性作用。结果见图 1、表 1。

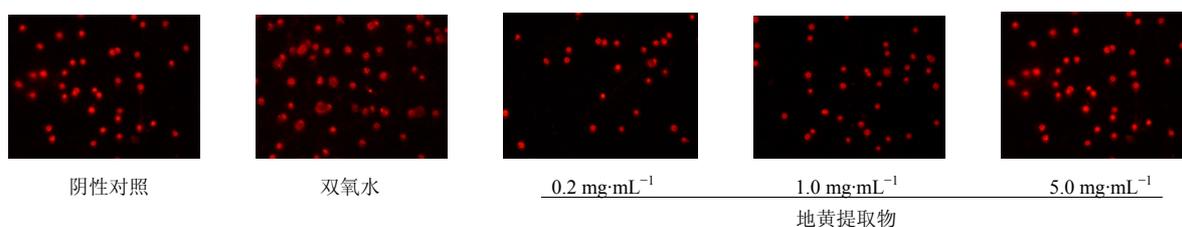


图 1 地黄提取物对 CHL 细胞 DNA 损伤的彗星图形

Fig.1 Comet picture of DNA damage of CHL cell induced by *Rehmanniae Radix* extract

表 1 地黄提取物对 CHL 细胞 DNA 的损伤作用 (x̄ ± s, n = 50)

Table 1 DNA damage of CHL cell induced by *Rehmanniae Radix* extract (x̄ ± s, n = 50)

组别	染毒质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	彗星长/μm	尾长/μm	Olive 尾矩	尾 DNA 率/%	尾长/头长
对照	—	18.68 ± 2.32	0.90 ± 0.89	0.19 ± 0.18	3.33 ± 3.25	0.05 ± 0.05
双氧水 (30%)	—	28.84 ± 0.06**	2.52 ± 1.67**	0.41 ± 0.32**	4.70 ± 3.03*	0.10 ± 0.06**
地黄提取物	0.2	18.76 ± 3.84	0.94 ± 1.04	0.19 ± 0.26	3.24 ± 4.16	0.05 ± 0.06
	1.0	18.74 ± 5.90	0.80 ± 1.07	0.20 ± 0.23	3.18 ± 3.55	0.04 ± 0.05
	5.0	18.62 ± 3.36	0.94 ± 0.91	0.19 ± 0.22	3.43 ± 3.28	0.05 ± 0.05

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs control group

3 讨论

新药临床前安全评价中遗传毒性试验可分为体内和体外试验,用于检测通过不同机制直接或间接诱导遗传学损伤的化合物,这些试验能检测出 DNA 及其固定损伤。由于没有一个单一试验能检测所有遗传毒性终点,因此通常采用一组遗传毒性体内和体外试验,这些试验相互补充。我国遗传毒性试验组合由微生物回复突变试验、哺乳动物培养细胞染色体畸变试验和啮齿动物微核试验组成。但是,当受试物的标准 3 项组合试验结果不一致时,则需要引入新的试验进一步评价已确认药物是否会引引起遗传毒性。新颁布的《药物遗传毒性研究技术指导原则》中,单细胞凝胶电泳(彗星实验)已作为遗传毒性试验组合外的备选试验项目。单细胞凝胶电泳与其他遗传毒性检测方法相比,具有灵敏度高、样品需量少(<1 000 个)、价格便宜、便于应用、耗时短及可在致变剂作用较短时间内检测出 DNA 的即时损伤情况等优点^[9]。既可体外染毒又可进行体内实验,克服了体外实验不能反映体内作用情况的缺点;实验所需的仪器、设备一般实验室都可具备,适用于大样本量调查、分析。本实验结果表明单细胞凝胶电泳可以具有以上优势,可以为新药的临床前评价研究提供更多的数据支持,提高新药临床前评价的研究效率。

参考文献

- [1] Ahnstrom G. Techniques to measure DNA single-strand breaks in cells: a review [J]. *Int J Radiat Biol*, 1988, 54 (5): 695-707.
- [2] Whitaker S J, Powell S N, Mcmillan T J, *et al*. Molecular assays of radiation-induced DNA damage [J]. *Eur J Cancer*, 1991, 27(7): 922-928.
- [3] Ostling O, Johanson K J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 123(1): 291-298.
- [4] Olive P I, Wlodek D, Banath J P, *et al*. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis [J]. *Cancer Res*, 1991, 51(17): 4671-4676.
- [5] Fairhairm D W, Olive P L, O'Neill K L. The comet assay: A comprehensive review [J]. *Mutation Res*, 1995, 339(1): 37-59.
- [6] Tice R R, Agurdl E, Anderson D, *et al*. Single cell gel-comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing [J]. *Envir Molecul Mutag*, 2000, 35(3): 206-221.
- [7] 傅鹏, 张建军, 姜凌, 等. 新药评价中彗星试验方法学研究及发展趋势 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(4): 287-28.
- [8] 史大永, 贺娟, 许凤, 等. 松节草醇提取物对正常小鼠抗氧化活性的影响 [J]. *中草药*, 2009, 40(1): 97-99.
- [9] 杨建一, 彭芸, 李莉, 等. 用 SCGE 分析甲氨蝶呤对小鼠体内多个组织器官 DNA 损伤作用 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2005, 17(5): 298-301.

中草药杂志社 4 种期刊为允许刊载处方药广告的 第一批医药专业媒体

根据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知,中草药杂志社编辑出版的《**中草药**》、*Chinese Herbal Medicines (CHM)*、《现代药物与临床》、《药物评价研究》4 本期刊作为第一批医药专业媒体,允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话: (022)27474913 23006821 传真: 23006821 联系人: 陈常青

网址: www.中草药杂志社.中国; www.tiprpress.com E-mail: zcy@tiprpress.com