

黄芪在《神农本草经》中被列为上品,为补药之长,具有“益气补虚,扶正固本”之功效,其主要成分为黄芪多糖和黄芪皂苷^[5]。注射用黄芪多糖是通过专利技术获得纯化的阿拉伯半乳糖聚合物,质量分数达到98.5%,临床前研究资料表明该药可以增加动物脾质量,增加小鼠巨噬细胞的吞噬功能;促进人外周血淋巴细胞的增殖功能;增强NK细胞和LAK细胞活性,显著增强某些细胞因子的分泌;促进骨髓造血干细胞的增殖和向红细胞系和粒细胞系的分化,并对放疗后所致骨髓造血功能的破坏有明显的保护作用^[6]。本临床研究结果表明,注射用黄芪多糖可增强机体免疫功能,提高患者生活质量^[7],延长患者的生存时间,且无毒性作用,体现了中药治

疗肿瘤对机体的多层次、多环节、多靶点的整体调节,值得临床应用及推广,并且今后应进一步发展临床研究,深入探讨中药治疗原发性肝癌的作用机制。

参考文献:

- [1] 叶任高,陆再英.内科学[M].北京:人民卫生出版社,2004.
- [2] 谭庚发,韩永兴.中医中药治疗原发性肝癌研究进展[J].中国现代实用医学杂志,2006,5(1):43-45.
- [3] 周际昌.实用肿瘤内科学[M].北京:人民卫生出版社,1999.
- [4] 中药新药临床研究指导原则(试行)[S].1999.
- [5] 张蕴超,贾英杰,陈军.注射用黄芪多糖治疗肝癌相关疲劳临床观察研究[J].中草药,2008,39(3):417-418.
- [6] 赵美蓉,周洁.黄芪多糖对恶性肿瘤化疗后骨髓抑制的影响[J].天津中医药,2007,24(2):114-115.
- [7] 何伟星,朱艳仪,李捷.注射用黄芪多糖对食管癌放疗患者生活质量的影响[J].江西中医药,2007,38(2):37-38.

大黄酸对小鼠淋巴瘤 L5178Y 细胞 TK 基因的致突变作用

董红远^{1,2},曾文³,江振洲¹,程安春³,张陆勇¹,刘国卿^{1*}

(1. 中国药科大学药学院,江苏南京 210009; 2. 国家药品审评中心,北京 100038;

3. 四川农业大学实验动物工程技术中心,四川雅安 625014)

摘要:目的 评价大黄酸对小鼠淋巴瘤 L5178Y 细胞 TK 基因的致突变作用。方法 小鼠淋巴瘤细胞在代谢活化或非代谢活化条件下暴露于 50、200、350、500 $\mu\text{g/mL}$ 大黄酸 3 h,处理后第 2 天将细胞接种于含有突变选择剂三氟胸苷的 96 孔板中,计数各剂量组的突变细胞集落数。通过计算第 0 天的相对存活率 (relative survival, RS)、相对悬浮增长率 (relative suspension growth, RSG) 和相对总增长率 (relative total growth, RTG) 确定细胞毒性。用 MUTANT 软件包计算各种细胞毒性参数和突变率,并对突变率数据进行统计分析。结果 在非代谢活化条件下,50、200、350、500 $\mu\text{g/mL}$ 的大黄酸均未诱导 L5178Y 细胞的突变率增加,阳性对照组诱导的突变率显著增加;在代谢活化条件下,大黄酸 350 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组诱导 L5178Y 细胞的突变率增加,阳性对照组诱导的突变率显著增加。结论 在非代谢活化条件下大黄酸各剂量组对小鼠淋巴瘤 L5178Y 细胞 TK 基因无致突变作用;在肝微粒体酶系 S₉ 代谢活化条件下,出现了弱致突变性。

关键词: 大黄酸; L5178Y 细胞; TK 基因

中图分类号: R285.53

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)12-1858-03

TK 基因突变试验是一种国外已广泛使用的体外短期致突变实验,具有很高的灵敏度,可检出包括点突变、大的缺失、重组、染色体异倍性和其他较大范围基因组改变在内的多种遗传改变。TK 基因突变试验采用的靶细胞系主要有小鼠淋巴瘤细胞 L5178Y 以及人类淋巴瘤细胞 TK6 和 WTK1 等,其基因型均为 tk^{+/+}。使用 L5178Y 细胞的试验(即小鼠淋巴瘤细胞试验)发展较早,已形成一套比较

完善的方法^[1]。而 TK6 和 WTK1 等人类来源的细胞在 TK 基因突变分析中的应用时间还不长,但因为来源于人类,在评价受试物对人体的损伤方面意义可能更大。大黄酸高剂量有抑菌作用^[2],限制了 Ames 实验对供试品有无致突变作用的评价。本实验评价大黄酸对小鼠淋巴瘤 L5178Y 细胞 TK 基因是否有致突变作用,为其安全性评价提供依据。

1 材料

• 收稿日期:2008-07-09

基金项目:国家中医药管理局中医药科学技术研究专项资助项目(国中医药科 2004ZX05);科技部“十五”重大专项(863 计划)资助项目(2002AA223113)

作者简介:董红远,男,于国家药品审评中心工作。

* 通讯作者 刘国卿 Tel: (025) 83271500 E-mail: lyzhang@cpu.edu.cn

1.1 药品与试剂:大黄酸(质量分数 92%),中国药科大学植物化学教研室提供,批号 0403A;二甲亚砜(DMSO),Sigma 公司提供,批号 31K34;甲基甲烷磺酸乙酯(MMS),Kyowa 生产,批号 392ABI;环磷酸胺(CP),上海华联制药有限公司提供,批号 040626。

1.2 细胞和细胞培养:小鼠淋巴瘤 L5178Y-3.7.2c/TK⁺细胞,日本国立卫生研究所提供;细胞培养液为含 10% 热灭活马血清的 RPMI 1640 培养液(R10),补充 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 丙酮酸钠,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度下常规悬浮培养。培养基为 RPMI 1640, GibcoBrl, 批号 1071044;马血清(CMHS);R0 为不含马血清的 RPMI 1640 培养基;R10 为含 10% 马血清的 RPMI 1640 培养基;R20 为含 20% 马血清的 RPMI 1640 培养基。

1.3 动物:雄性 SD 大鼠 5 只,四川大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(046)。

2 方法

2.1 Aroclor1254 诱导的大鼠肝微粒体酶系 S_9 的制备^[3]:取 200 g 左右的雄性 SD 大鼠 5 只,单次 ip 500 mg/kg Aroclor 1254, 5 d 后处死。取出肝脏,称质量,每克肝组织加 3 mL 冰冷的 0.15 mol/L KCl,将肝组织制成匀浆,9 000 $\times g$ 离心 10 min。取上清液,分装于小瓶中,液氮中贮存。 S_9 混合液配制比例:180 mg/mL 6-磷酸葡萄糖(G-6-P) 2 mL, 25 mg/mL NADP 2 mL, 150 mmol/L KCl 2 mL, 大鼠肝微粒体酶 S_9 4 mL,使用时 S_9 的终体积分数为 2%。

2.2 剂量的确定:进行剂量范围确定试验,以阴性对照组相对存活率 10%~20% 的剂量作为正式实验的最高剂量,并向下设置 3 个剂量,同时设置阴性对照和阳性对照。

2.3 致突变性试验:取处于指数生长期的细胞,用 R10 培养液调整浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液。实验分组为大黄酸 500、350、200、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组,阳性对照分别为 MMS 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (非代谢活化)和 CP 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (代谢活化),阴性对照为 DMSO。以 2% 体积分数分别加入受试药物或对照品,总反应体积为 10 mL,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡处理 3 h。处理结束后,将含有供试品的细胞悬液离心,然后用 R0 培养液清洗细胞 1 次,离心后将细胞重悬于 10 mL R10 培养液中。计数细胞,调整细胞密度至 2×10^5 个/mL。然后取少许用 R20 培养液配制成 8 个/mL 的细胞悬液,于 96 孔板中每孔加入 0.2 mL 不同浓度的供试品溶液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度下培养 12~

14 d,计数含有细胞集落的孔数,计算平板效率 PE0。其余细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 条件下表达培养 2 d,记录第 2 天的平板效率 PE2。在表达期结束时,计数细胞后用 R20 培养液将细胞配制成 1×10^4 个/mL 的细胞悬液,取适量细胞用 R20 培养液配制成 8 个/mL 的细胞悬液,并接种于 96 孔板中,每孔 0.2 mL (复孔),12~14 d 后观察长出集落的孔数,用于检测细胞活力。剩余细胞 (1×10^4 个/mL) 中加入终质量浓度为 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 TFT,接种于 96 孔板中,每孔 0.2 mL (复孔)。12~14 d 后肉眼观察孔中是否存在 TFT 抗性细胞集落,并分别记录大集落和小集落数。出现污染的孔不作为观察对象,将其从总孔数(TW)中减去。

2.4 计算方法

2.4.1 平板效率(plating efficiency PE):按下式计算。

$$PE = \frac{-\ln(EW/TW)}{n}$$

EW 为不含集落的孔数,TW 为总孔数, n 为每孔的平均细胞数,在此实验中 $n=1.6$

2.4.2 相对存活率(relative survival, RS):按下式计算。

$$RS0 = PE0(\text{处理组})/PE0(\text{阴性对照组}) \times 100\%$$

$$RS2 = PE2(\text{处理组})/PE2(\text{阴性对照组}) \times 100\%$$

2.4.3 相对总增长率(relative total growth, RTG): $RTG = RSG \times RS2$

2.4.4 突变率(mutation frequency, MF):

$$MF = \frac{-\ln(EW/TW)/n}{PE2}$$

EW 为不含任何集落的孔数,TW 为总孔数,此处为 192 (2 块板的总孔数, n 为每孔的平均细胞数,此处为 2 000)

2.5 统计分析:数据用 MUTANT 软件统计分析。

2.6 试验结果的判定

2.6.1 阳性结果的判断标准:符合下列标准,判断为致突变试验阳性。与溶剂对照组相比,处理组 1 个或多个剂量组的突变率显著升高,并具有统计学显著性差异($P < 0.05$);剂量相关性;具有可重复性。

2.6.2 试验成立的条件:阳性对照出现明确的阳性结果,通常阳性对照的突变率至少为阴性对照的 2 倍以上。

3 结果

3.1 剂量:根据剂量范围确定试验的结果,选择 500、350、200、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4 个剂量进行正式实验。

3.2 非代谢活化条件下结果:见表 1。在非代谢活化试验中,500、350、200、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 大黄酸的 RTG 分别为溶剂对照组的 23%、26.3%、52.8%、

60.1%。大黄酸各剂量组的突变率未见增加。500 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组的 RTG 达到了 23%, 处理结束后有受试物析出, 在此较高的细胞毒性下, 细胞存活较少, 所以该剂量组的突变平板长出的集落数很少, 在这样的条件下, 计算出的突变频率值是无意义。

3.3 代谢活化条件下结果: 见表 2。在代谢活化试验中, 500、350、200、50 $\mu\text{g/mL}$ 大黄酸的 RTG 分别为溶剂对照组的 3.0%、12.8%、49.1%、43.5%。大黄酸 350 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组的突变率较阴性对照组显著增加。与不加 S_9 的最高剂量组相似, 加 S_9 的 500 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组细胞存活率更低, 析出较多, RTG 高达 3.0%, 其突变平板上没有突变集落生长, 该剂量组突变频率结果无意义。350 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组的细胞毒性也较强, 达到了 12.8%, 仅在此剂量组出现阳性结果, 提示该受试物在小鼠淋巴瘤细胞 TK 突变试验中有弱诱变性。

表 1 大黄酸致小鼠淋巴瘤 L5178Y 细胞 TK 基因突变性试验结果 (不加 S_9)

Table 1 Results of mutagenicity of rhein in TK gene of L5178Y mouse lymphoma cells (without S_9)

组 别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	RS0/%	RTG/%	MF($\times 10^{-6}$)
溶剂对照	0	100.0	100.0	54.2
大黄酸	50	74.4	60.2	82.6
	200	64.5	52.8	54.4
	350	61.0	26.3	87.2
	500	68.3	23.0	7.2
MMS	5	72.3	28.8	243.2*

与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs solvate control group

表 2 大黄酸致小鼠淋巴瘤 L5178Y 细胞 TK 基因突变性试验结果 (加 S_9)

Table 2 Results of mutagenicity of rhein in TK gene of L5178Y mouse lymphoma cells (with S_9)

组 别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	RS0/%	RTG/%	MF($\times 10^{-6}$)
溶剂对照	0	100.0	100.0	78.8
大黄酸	50	93.0	43.5	90.5
	200	64.3	49.1	87.2
	350	45.1	12.8	477.7*
	500	11.0	3.0	突变集落生长
CP	3	65.9	46.1	295.0*

与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs solvate control group

4 讨论

哺乳动物体外培养细胞的基因正向突变试验常用的测试系统有小鼠淋巴瘤 L5178Y 细胞、中国仓鼠肺 V79 细胞和卵巢 CHO 细胞的 3 个基因位点的突变, 即次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT)、胸苷

激酶 (TK) 及 Na^+/K^+ -ATP 酶 (OUA) 位点^[4]。HGPRT 和 TK 位点突变可用于上述 3 种细胞, OUA 位点突变仅适用于 CHO 细胞, HGPRT 和 TK 可分别使 6-硫代鸟嘌呤 (6-TG) 转移上磷酸核糖及使 5-溴脱氧尿苷磷酸化, 它们的代谢产物可掺入 DNA 引起细胞死亡, 因此正常细胞在含有这些碱基类似物的培养基中不能生长, 在致突变物作用下此两个位点发生突变的细胞对这些碱基类似物具有抗药性, 可以增殖成为克隆 (细胞集落)。

正式实验前大黄酸以 DMSO 溶解配制成为 700、500、250、125、62.5、31.25 $\mu\text{g/mL}$ 进行剂量范围确定试验, 计算各剂量组的相对存活率, 以阴性对照组相对存活率的 10%~20% 的剂量作为正式试验的最高剂量, 结果显示 700 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组出现严重析出, 影响结果判断; 500 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组出现少许析出, 相对存活率不低于正式实验要求, 故选择为最高剂量。

本研究的结果表明在非代谢活化条件下, 500、350、200、50 $\mu\text{g/mL}$ 大黄酸未见诱导小鼠淋巴瘤 L5178Y 细胞 TK 基因的突变率增加; 在代谢活化条件下, 大黄酸 350 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组诱导小鼠淋巴瘤 L5178Y 细胞 TK 基因的突变率增加, 提示该受试物在小鼠淋巴瘤细胞 TK 突变试验中有弱诱变性。但体外研究并不完全代表体内过程, 即使对大黄素而言, 虽然文献报道其有诱导突变作用^[5,6], 但是动物实验亦未证实其有明确的致癌作用。因此, 对于大黄及其衍生物致突变作用有待于更进一步的研究。大黄的种类较多, 成分复杂, 在实际应用中应注意选择大黄的品种, 选用《中国药典》规定的正品大黄。

参考文献:

- [1] 帅培强, 王怡净, 张立实. TK 基因突变试验-L5178Y 细胞与 TK6 细胞的比较研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 2001, 13(4): 251.
- [2] 徐 艳, 曹松屹, 曲格鑫. 大黄抑菌作用的体外研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(2): 43.
- [3] 阮丽荣, 徐友梅, 郑其凤, 等. 不同方法诱导大鼠肝 S_9 对前体致癌物活化能力的比较 [J]. 河南医科大学学报, 1988, 23(3): 210.
- [4] 张天宝. 新药遗传毒性评价方法的研究现状和发展趋势 [J]. 癌变·畸变·突变, 2002, 04(11): 243.
- [5] Mueller S O, Schmitt M, Dekant W, et al. Occurrence of emodin, chrysophanol and physcion in vegetables, herbs and liquors. genotoxicity and anti-genotoxicity of the anthraquinones and of the whole plants [J]. Food Chem Toxicol, 1999, 37: 481.
- [6] Mueller S O, Stopper H. Characterization of the genotoxicity of anthraquinones in mammalian cells [J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1428: 406.