

文章编号:1004-616X(2002)02-0144-03

· 论著 ·

FISH技术评价昆明山海棠在小鼠骨髓细胞中的非整倍体诱发效应

丁银润, 王晓燕, 汪旭*

(云南师范大学生命科学学院遗传室, 云南 昆明 650092)

【摘要】目的: 研究以荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 技术评价了中草药昆明山海棠根部水抽提物 [*Tripterygium hypoglaucum* (Level) Hutch, THH] 在小鼠骨髓细胞中的特异染色体不分离效应。方法: 以受试物 THH 腹腔注射昆明种雄性小白鼠, 24 h 后取骨髓细胞常规制片, 以 bio-16-dUTP 标记的 8 号染色体特异性着丝粒重复顺序探针进行 FISH, 并以 streptavidine-Cy3 与杂交信号结合。荧光显微镜下分析受试物处理动物后骨髓细胞 8 号染色体分离情况。结果: 在 3 个受试剂量中, THH 具有与阳性对照秋水仙素类似的作用趋势, 其所诱发的 8 号染色体不分离频率均显著高于溶剂对照。结论: 本研究证实了 THH 为小鼠骨髓细胞 8 号染色体异常分离的诱发因素。

【关键词】 荧光原位杂交; 昆明山海棠; 小鼠骨髓细胞; 非整倍体

中图分类号: R99.4

文献标识码: A

ANEUPLOIDY INDUCTION BY THE WATER EXTRACT OF TRIPTERYGIUM HYPOGLAUCUM (LEVEL) HUTCH IN MOUSE BONE MARROW CELLS DETECTED BY FISH

DING Yin-run, WANG Xiao-yan, WANG Xu

(Genetic laboratory, School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650092, China)

【Abstract】 Purpose: The water extract of a Chinese herb, *Tripterygium hypoglaucum* (Level) Hutch (THH) was assayed for its effects of aneuploidy induction in mouse bone marrow cells by means of fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Methods:** Kunming species mice were injected with THH into the abdominal cavity and killed at 24 h after treatment. The bone marrow cell slides were prepared by general methods. FISH was carried out with Bio-16-dUTP-labeled chromosome 8 probe. The hybridization signals were detected by combining streptavidine-Cy3. **Results:** In three dose groups THH-induced chromosome 8 aneuploidy and the aneuploidy frequencies of chromosome 8 were significantly higher than the solvent control ($P < 0.001 \sim 0.05$). **Conclusion:** The result indicated that THH is aneugen of chromosome 8 in mouse somatic cells.

【Key words】 fluorescence *in situ* hybridization; *Tripterygium hypoglaucum* (Level) Hutch; mouse bone marrow cell; aneuploidy

细胞分裂过程中的染色体异常分离, 可造成细胞中整条染色体的获得与丢失, 从而形成非整倍体。非整倍体是重要的遗传损伤类型, 并且是人类群体中许多遗传疾病、生殖异常和癌症的起因。据报道: 50% 的人类自发流产是由于非整倍体而引起的¹; 异常

新生儿中, 非整倍体 (三体) 的频率也较高²。非整倍体引起的癌症、人类自发流产和异常新生儿, 构成了严重的社会问题和经济问题。鉴于各类非整倍体诱发剂在细胞中的作用靶标不同³, 建立各类具不

收稿日期: 2001-07-24; 修订日期: 2001-09-30

基金项目: 国家自然科学基金 (39860035)、云南省科委国际合作计划 (98C013) 资助

作者简介: 丁银润 (1975-), 女, 云南大理人, 硕士研究生, 主要从事遗传毒理学研究。

* 通讯作者

同终端指标的非整倍体诱发剂检测系统是遗传毒理学中的重要课题。

昆明山海棠 [*Tripterygium hypoglaucom* (Level) Hutch, THH 为卫茅科雷公藤属植物,是云南地方中草药,其主要化学成分为生物碱、萜类、内酯及皂甙等⁴。多年来,该药物一直用于治疗类风湿性关节炎、红斑性狼疮等免疫性疾病,广泛应用于临床。本实验室以前的研究表明,THH在Ames试验中能诱发基因突变、人类外周血淋巴细胞中的姐妹染色单体交换⁵;另外,THH能使小鼠骨髓细胞微核频率和C-有丝分裂效应频率显著升高⁶。为了解THH在哺乳动物细胞中的特异染色体分离效应,本研究应用荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 技术,直接评价 THH 诱发小鼠骨髓特异染色体的不分离效应。秋水仙素 (colchicine, COL) 为本试验的阳性对照物。

1 材料与与方法

1.1 受试物的制备

昆明山海棠根部生药购自昆明市医药公司。取昆明山海棠根部粉碎物 100 g,以 1 000 ml 双蒸水浸泡 1 h,煮沸 3 次,每次 30 min,滤渣,浓缩为 50 ml, -20℃ 保存,浓度以 2 g/ml 生药计,抽干得率为 4.8%,用前以无菌双蒸水稀释。秋水仙素 (购自上海化学试剂采购供应站) 用前以无菌双蒸水配制。

1.2 实验动物

实验动物为雄性昆明种小白鼠,购自昆明医学院动物房 (2000004 号),10~12 周龄,体重 25~30 g,每剂量组设 5 只动物,鉴于动物的遗传同源性,所有溶剂对照组归并为 1 组。

1.3 实验动物处理及染色体制片

以受试物 THH (120 mg/kg bw, 240 mg/kg bw, 480 mg/kg bw) 或阳性对照 COL (1.5 mg/kg bw) 腹腔注射动物,24 h 后,断颈处死动物,将两侧股骨骨髓悬浮于小牛血清中 (崇明县星新小牛血站),1 000 r/min 离心 5 min,常规低渗、固定、制片、空气干燥, -20℃ 保存。

1.4 DNA 探针的制备

含有小鼠 8 号染色体着丝粒片段的重组质粒 *E. coli* 菌株 4a 和 5e 由德国国家环境与健康研究中心遗传学研究所 (GSF) 赠送。将细菌接种于含氨苄青霉素 (100 µg/ml) 的 LB 液体培养基中,37℃ 培养 24 h。利用 Promega 公司的 Wizard Plus Midipreps DNA

Purification System 提取质粒 DNA。采用 Life Technologies 公司的 Nick Translation System 与 bio-16-dUTP 进行探针标记。

1.5 FISH

将标记好的小鼠 8 号染色体探针与杂交液 MM2.1 (55% 甲酰胺,10% 硫酸葡聚糖/2 ×SSC) 混合,76℃ 变性 10 min,立即转入冰浴中,将已预先解冻的小鼠骨髓细胞制片放于 2 ×SSC 和 4% 多聚甲醛中,室温下各处理 10 min。然后又放于 37℃ 的 0.002% 胃蛋白酶 (pepsin) 中消化 10 min,于 4℃ 的 70%、90%、100% 乙醇系列脱水各 2 min,冷风吹干后,于 76℃ 的 70% 甲酰胺/2 ×SSC (pH7.0) 中变性 8 min,系列乙醇脱水,37℃ 吹干并将变性的探针转移到变性的标本上,覆以盖片,橡胶水泥封片后,转入 37℃ 湿盒杂交 24~48 h。杂交后将封胶揭去,分别置 44℃ 50% 甲酰胺/2 ×SSC (pH7.0) 和 PN-buffer (0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液,0.1% NP-40) 中各洗涤 30 min。将 40 µl avidin-FITC (Sigma A2050,1.5 mg/ml 蛋白的原液 avidin-FITC 1 µl 混合于 140 µl PN-buffer) 置杂交后的标本上,以石蜡膜覆盖,避光室温孵育 30 min,染色质以 0.05 µg/ml DAPI 复染,染色完毕后,加 20 µl vectashield 封片剂,覆以盖片,荧光显微镜下分析标本或于 4℃ 避光保存。

1.6 杂交标本分析

标本分析在 Nikon ECLIPSE E400 型荧光显微镜下进行。正常骨髓间期白细胞具有 2 个 8 号染色体,出现 2 个绿色荧光杂交信号,而异常细胞具有 1 个信号 (单体)、3 个信号 (三体)、4 个信号 (可能四倍体) 或者没有信号 (缺体或杂交失败)。为了排除杂交因素导致的缺体细胞和四倍体的可能性,所以分析的焦点只放在单体和三体。判断骨髓细胞核内出现异常数目的染色体必须满足 2 个条件:杂交信号的大小和亮度相同;若干杂交信号之间的距离不小于其中任何一个信号的直径。每一动物分析 1 000 个骨髓间期白细胞,以 Yates 卡方校正测验做统计学分析。

2 结果

表 1 和图 1 表明阳性对照物 COL 以较高的频率诱发小鼠骨髓间期白细胞 8 号染色体不分离,异常细胞数为溶剂对照 1.58 倍 ($P < 0.001$),非整倍体频率极显著高于对照。THH 在 3 个受试的剂量组中,具有与 COL 类似的作用趋势:最低剂量组 (120 mg/kg bw) 非整倍体频率为溶剂对照的 1.31 倍 ($P < 0.05$);

中间剂量组(240 mg/kg bw)和最高剂量组(480 mg/kg bw)异常骨髓细胞频率极显著高于对照组,其非整倍体频率分别为对照的1.50倍和1.57倍($P < 0.001$)。

8号染色体数目正常与异常的骨髓细胞类型见图2a、2b、2c。

表1. THH、COL处理小鼠后骨髓细胞8号染色体非整倍体频率

Table 1. Aneuploidy frequencies in mouse bone marrow cells after treatment with THH and COL.

	Dose (mg·kg ⁻¹)	Observed cell (n)	Abnormal cell (n)	Chromosome 8 aneuploidy (1 and 3 signals, %)
Control	0	5 156	128	2.48
COL	1.50	5 188	204	3.93 **
THH	120.00	5 144	167	3.25 *
	240.00	5 127	191	3.73 ***
	480.00	5 146	202	3.91 ****

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ (Yates χ^2 correction test), compared with control group.

图1. THH、COL处理小鼠后骨髓细胞8号染色体非整倍体频率

Figure 1. Aneuploidy frequencies in mouse bone marrow cells after treatment with THH and COL

图2. 小鼠骨髓细胞荧光原位杂交显微照片

Figure 2. FISH photomicrographs in mouse bone marrow cells

a: abnormal cell (two signals for chromosome 8); b: abnormal cell (three signals for chromosome 8, triploidy); c: abnormal cell (one signal for chromosome 8, monploidy)

3 讨论

非整倍体诱发剂(aneugen)是一类通过引发染色体异常分离,导致体细胞癌变、自发流产和遗传病的重要遗传毒性因素,因此,探索各种不同类型非整倍体诱发剂作用机制,了解它们对特异染色体分离的效应,是对这一类遗传毒性物质进行有效监控,提高人类生存环境质量、减少人类遗传负荷的重要途径。

以往的工作证明昆明山海棠的水提取物具有低度基因毒性效应:在对细菌无明显杀伤作用的剂量下,THH能诱发鼠伤寒沙门氏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SCE频率显著升高⁵。原核生物测试系统与高等真核生物测试系统所获结果相互印证了THH基因毒

性的存在。此外,THH对动物有丝分裂和减数分裂过程均具有明显的抑制效应⁶。在微核和染色体畸变试验中,THH使小鼠骨髓细胞微核频率显著上升但不诱发染色体断裂,提示诱发微核由落后染色体形成⁷。曹佳等人的研究也显示出THH诱导的微核(MN)主要是来源于染色体异常分离后丢失的整条染色体^{10,11}。研究THH在哺乳动物是否具有诱发特异染色体的倾向性对于其遗传毒性的机制探讨具有重要作用。我们已经发现THH在小鼠精子中显著诱发8号染色体不分离⁸,且在雌、雄果蝇的生殖细胞形成过程中也表现出染色体不分离诱发效应,使染毒果蝇后代的非整倍体频率显著升高⁹。在以往工作基础之上,本实验选择了小鼠常染色体即8号染色体进行FISH,评价了THH在小鼠骨髓间期白细

文章编号:1004-616X(2002)03-0147-04

论著·

不同浓度的一氧化氮对食管癌细胞核DNA的损伤作用

李恩民^{*1}, 杨帆¹, 温博贵¹, 吴健谊¹, 陈爱云¹, 陈玮莹¹, 黄革², 许丽艳³

(1. 汕头大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 广东 汕头 515031; 2. 汕头大学医学院卫生学教研室, 广东 汕头 515031; 3. 汕头大学医学院肿瘤病理研究室, 广东 汕头 515031)

【摘要】目的: 研究不同浓度的一氧化氮(nitric oxide, NO)对食管癌细胞核DNA损伤作用的特征性规律。方法: 以亚硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)作为NO的体外供体, 以食管癌细胞系EC109作为细胞模型, 采用单细胞凝胶电泳法检测不同浓度的SNP作用一定时间后, 食管癌细胞核DNA被损伤的情况。结果: 无论SNP的作用时间是8 h, 还是16 h, 彗星状细胞核所占的百分率均越来越高, 经²检验差异有显著性意义($P < 0.01$)。曲线回归分析结果表明, 食管癌细胞彗星状细胞核生成的百分率与SNP的浓度之间明显相关。结论: 在一定的条件下, NO对食管癌细胞核DNA的损伤作用具有明显的浓度依赖性特征。

【关键词】一氧化氮; 食管癌细胞; 细胞核DNA损伤; 单细胞凝胶电泳法

中图分类号: R73-34 文献标识码: A

DAMAGE EFFECT OF VARIOUS CONCENTRATION NITRIC OXIDE ON THE NUCLEAR DNA IN THE ESOPHYGEAL CARCINOMA CELLS

胞中的特异染色体不分离诱发效应。结果发现, THH处理小鼠后, 8号染色体数目异常细胞数显著升高。该结果不仅进一步证实了THH在哺乳动物体细胞中的非整倍体诱发效应, 同时将THH非整倍体诱发效应与特异染色体的异常分离直接衔接, 更为精确地分析了THH的遗传靶标。THH对其他染色体分离的效应还有待进一步研究。

参考文献:

- 1 Sankaranarayanan K. The role of non-disjunction in aneuploidy in man, An overview J. *Mutat Res*, 1979, 61(1): 1~28.
- 2 Hernandez A, Reynoso MC, Soto F, et al. Aneuploidies, chromosome aberrations and dominant gene mutations detected in 113,913 consecutive newborn children in Mexico J. *Mutat Res*, 1990, 232(1): 23~29.
- 3 Bond DJ. Mechanisms of aneuploid induction J. *Mutat Res*, 1987, 181(2): 257~266.
- 4 王浴生. 中药药理与应用 M. 北京: 人民卫生出版社, 1983. 66~673.
- 5 汪旭, 周汝敏, 严勇, 等. 昆明山海棠遗传毒性评价 J. *遗传*, 1993, 15(6): 13~16.
- 6 合正基, 周汝敏, 汪旭. 有丝分裂抑制剂诱发小鼠骨髓细胞C-有丝分裂效应研究 J. *云南师范大学学报*, 1992, 12(3): 15~18.
- 7 Wang Xu, Zhou Rumin, He Zhengji. Aneuploidy induction by water extract from *Tripterygium hypoglaucum* (Level). Hutch in mouse bone marrow cells J. *Mutagenesis*, 1993, 8(5): 395~398.
- 8 丁润涛, 王晓燕, 汪旭. 昆明山海棠诱发小鼠精子非整倍体的研究 J. *云南师范大学学报*, 2001, 21(4): 54~57.
- 9 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 J. *遗传*, 1995, 17(5): 34~36.
- 10 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 J. *遗传*, 1997, 19(1): 1~3.
- 11 杨明杰, 曹佳. 多色荧光原位杂交对昆明山海棠和丙烯酰胺诱发微核染色体组成的研究 J. *细胞生物学杂志*, 2000, 22(4): 212~215.

收稿日期: 2002-01-04; 修订日期: 2002-01-21

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(990799), 广东省自然科学基金博士启动基金资助项目(984068), 广东省医学科学技术研究基金资助项目(B1999105)。

作者简介: 李恩民(1963-), 内蒙古赤峰市人, 副研究员, 博士, 主要从事肿瘤相关基因克隆及其表达调控研究。

通讯联系人, Tel: 0754-8532720; E-mail: nmli@21cn.com