

苏乐康等对雌性激素和 γ 线联合 诱导的金黄地鼠胚胎细胞UDS的影响

周红宁 高凤鸣 李新兰

卫生部工业卫生实验所 北京 100088

摘要 雌性激素(戊酸雌二醇和己酸孕酮)和钴-60 γ 线联合作用于金黄地鼠胚胎细胞,可诱发该细胞的非程序性DNA合成(UDS)。但在给予诱变剂以前加入苏乐康、绿茶提取物、叔丁基羟基茴香醚(BHA),可使其标记细胞率及平均银颗粒数显著降低($P < 0.05$)。苏乐康等的这种作用,与其清除自由基,降低了自由基对DNA的损伤有关。结果提示我们:苏乐康等在肿瘤的化学预防上具有重要意义。

关键词: 苏乐康; 绿茶提取物; 叔丁基羟基茴香醚; 非程序性DNA合成

EFFECTION OF SULEKANG CAPSULA ETC ON UDS OF SYRIAN HAMSTER EMBRYO CELLS INDUCED BY FEMALE SEX HORMONES COMBINED WITH CO-60 γ RAYS.

Zhou Hongning, Gao Fengming, Li Xinlan

Laboratory of Industrial Hygiene, Ministry of Public Health, Beijing 100088

Abstract Female sex hormones(estradiol vaberate and hydroxyprogesterone caproate, EP) Combined with Co-60 γ -rays can induce unscheduled DNA Synthesis (UDS) of syrian hamster embyro (SHE) cells. If sulekang capsula(SC), green tea extract (GTE)and butylated hydroxyanisole(BHA)are given before Ep and γ -rays are given, Labelling index (LI) and average number of silver grains (AG) of SHE cells are decreased efficiently ($P < 0.05$). The probable mechanism of their effection is that they can scavenge the free radicals induced by EP and gamma rays, relax the damage of DNA, The results indicate that SC etc are most important factors in chemical prevention of cancers.

Key Words: Sulekang capsula; green tea extract; butylated Hydroxyanisole; unscheduled DNA synthesis

非程序性DNA合成(Unscheduled DNA Synthesis, UDS),即S期外的DNA合成,是检测环境致突变物、致癌物的有效短期测试方法之一。化学物质引起UDS的能力与其引起实验动物肿瘤的能力呈显著的正相关关系^(1,2)。大多数致癌物的靶物质是细胞核

DNA, DNA的损伤及其错误修复在细胞癌变中起着重要的作用。

本实验观察苏乐康(Sulekang Capsula, SC)、绿茶提取物(GreenTea Extract, GTE)和叔丁基羟基茴香醚(Butylatep Hydroxy-anisole, BHA)对雌性激素(戊酸雌二醇和

己酸孕酮, EP)和钴-60 γ 线体外联合诱导的金黄地鼠胚胎(Syrian Hamster Embryo, SHE)细胞UDS的作用。

材料和方法

1. 材料 苏乐康胶囊由苏州第三制药厂提供; 绿茶提取物由中国医学科学院肿瘤研究所程书钧教授馈赠; BHA 由上海益民食品四厂提供; EP由上海第九制药厂提供; RPMI-1640 为日本制药株式会社产品; 胎牛血清购自中国医学科学院血液学研究所; 3H-TdR 由中国原子能科学研究院同位素研究所生产; 羟基脲(H μ)由 Fluke公司生产; 叙利亚金黄地鼠孕鼠由中国科学院生物物理研究所动物房提供。

2. SHE细胞的体外培养 取妊娠 13 天的叙利亚金黄地鼠孕鼠 2 只, 无菌操作取出胚胎, 去头及内脏, 将躯干及四肢剪碎, 0.125%胰酶室温下消化30分钟, 100目铜网过滤, 网上滤块再消化 5 分钟, 过滤, 向收集的滤液中加入少量胎牛血清, 1000rpm 离心10分钟, 去上清液, 沉淀物中加入含15%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液, 吹匀, 计数, 按 1×10^6 细胞/瓶接种于 30ml 玻璃培养瓶中, 37 $^{\circ}$ C、10%CO $_2$ 、饱和湿度下培养, 24小时后弃去未贴壁细胞, 重新加入上述生长培养基, 作为原代细胞, 备用。

3. 分组 实验共分 8 组, 每组 3 瓶第 1 代SHE细胞, 每瓶按 1×10^6 细胞。

第 1 组 EP+ γ ; 第 2 组 空白对照
第 3 组 EP+ γ +GTE; 第 4 组 GTE
第 5 组 EP+ γ +SC ; 第 6 组 SC
第 7 组 EP+ γ +BHA; 第 8 组 BHA

EP在培养液中的最终浓度分别为 0.5 μ g/ml 和 25 μ g/ml, γ 线照射的剂量为 2.0Gy (DR=1.15Gy/min), SC、GTE、BHA 在培养液中的最终浓度为 25 μ g/ml, 25 μ g/ml 和5 μ g/ml。

4. 药物及试剂的加入 SHE 细胞接种 48h后, 分别加入SC、GTE、BHA, 12h后,

再加入 EP, 共同培养 24h 后, 换液, 中止 EP作用, 再加入 SC、GTE、BHA、H μ (最终浓度为 10mM)和3H-TdR(SA37ci/mM, 最终浓度为10 μ Ci/mlmed), 立即 γ 线照射, 继续培养 3h, 然后去掉培养基, 冷PBS洗 2 次, 胰酶加EDTA液消化, 1000rpm 离心 10 分钟, 去上清液, 沉淀物加一滴胎牛血清, 混匀, 涂片, 固定, 自然干燥后, 涂核-4乳胶, 干后放入有干燥剂的切片盒中, 蔽光, 防潮, 4 $^{\circ}$ C 冰箱内曝光 2 周, 显影、定影, HE染色。

5. 观察指标

5.1 细胞标记率: 每张片子计数500个细胞, 手出具有UDS银颗粒的细胞百分数。

5.2 平均标记银颗粒数: 每瓶计数一张片子, 每张片子计数20个标记细胞, 求出平均标记银颗粒数/细胞。

结果和讨论

实验各组的本底值为 0~1 银颗粒数/细胞核面积。不同组别的UDS细胞标记率及平均银颗粒数见表 1, 表 2。

表 1 不同组别的UDS细胞标记率

组 别	观察细胞数	标记细胞数	细胞标记率[%] ($\bar{X} \pm S$)
EP+ γ	4500	1242	27.60 \pm 1.96
EP+ γ +SC	4500	555	12.33 \pm 1.53*
EP+ γ +GTE	4500	525	11.67 \pm 1.36*
EP+ γ +BHA	4500	762	16.93 \pm 1.55*
SC	4500	376	8.36 \pm 1.54**
GTE	4500	383	8.51 \pm 1.27**
BHA	4500	369	8.20 \pm 1.24**
空白对照	4500	368	8.18 \pm 1.44

* 与EP+ γ 组比较, $P < 0.05$

** 与空白对照比较, $P > 0.05$

对于EP和 γ 线联合诱导的SHE细胞的UDS, SC, GTE, BHA使其标记细胞率及平均银颗粒数显著降低($P < 0.05$), SC、GTE、BHA在该作用浓度下, 其本身引起的UES与对照组相似($P > 0.05$)。

表 2 不同组别标记细胞的平均银颗粒数

组 别	观察细胞数	平均银颗粒数 ($\bar{X} \pm S$)
EP+ γ	60	12.35 \pm 2.37
EP+ γ +SC	60	10.15 \pm 2.16*
EP+ γ +GTE	60	10.03 \pm 2.18*
EP+ γ +BHA	60	11.23 \pm 2.49*
SC	60	5.37 \pm 1.65**
GTE	60	5.20 \pm 1.76**
BHA	60	5.58 \pm 1.88**
空白对照	60	5.40 \pm 1.75

* 与EP+ γ 组比较, $P < 0.05$ ** 与空白对照组比较, $P > 0.05$.

EP 对大鼠、小鼠、金黄地鼠均具有明显的致癌作用, EP和 γ 线联合作用, 能加重 γ 线的致癌作用, 表现在 γ 线诱发的肿瘤发生率明显升高, 恶性和良性肿瘤的发生数的比值升高^[3]。

UDS 代表非 S 期细胞的 DNA 合成, 其程度间接表示为 DNA 损伤的程度, 当受试物引起细胞核内的 DNA 损伤以后, 正常情况下可以通过切除修复过程进行修复, 由于这种 DNA 少量的修复合成是不经过 S 期的合成, 所以称之为 UDS。UDS 主要是在 G₁ 期合成, 也可以在 G₂ 期。如少数损伤未在 G₁ 期修复的可以通过 S 期 DNA 的重组加以修复 (复制后修复, 简称 PRR 系统)。如果损伤过重, 还可诱导 SOS 修复的发生^[4]。DNA 损伤后, 在有 Hu 存在的情况下, 培养液中的 3H-TdR 掺入到非 S 期细胞的 DNA 中, 用放射自显影的方法可显示细胞核内有银颗粒的存在。UDS 与肿瘤的发生呈正相关关系, 这在探讨肿瘤发生的机制方面具有重要的意义。

物理或化学致癌物质, 它们的共同特点是作用于靶细胞, 主要是通过产生短寿命的高活性自由基, 打断 DNA 键上的嘌呤和嘧啶碱基对, 或与胞核 DNA 结合, 形成 DNA 加合物, 引起 DNA 结构变化, 进而导致细胞突变、染色体畸变及肿瘤性转化^(5,6)。

苏乐康含有多种抗氧化性物质, 其中维

生素 E、蜂皇浆及人参均有捕获自由基的作用^(7,8); 绿茶提取物的主要成分是茶多酚, 这类化合物富含 OH 基团, 具有较强的抗氧化功能, 其捕获自由基的能力高于用等浓度的维生素 C 及 E^(9,10)。BHA 作为食品添加剂广泛应用于食品加工工业, 具有抗氧化和防腐作用。对许多化学致癌物具有加速解毒和阻断其与靶细胞 DNA 结合的作用, 对肿瘤的发生及癌前期病变的形成具有较强的抑制作用^(5,11)。

EP 和 γ 线联合应用, 通过产生高活性的自由基, 引起 SHE 细胞的 DNA 损伤, 启动了修复, 引起 UDS⁽¹²⁾。SC、GTE、BHA 具有清除自由基的能力, 从而减轻了 DNA 的损伤, 降低了 SHE 细胞的 UDS。这提示我们: 苏乐康、绿茶、BHA 在肿瘤的化学预防上具有重要意义。

(蒋涵英、王文惠、李曙同志参加了部分实验工作, 在此一并致谢)

参 考 文 献

1. Martin CN, et al. Testing of known carcinogens and non carcinogens for their ability to induce Unscheduled DNA Synthesis in HeLa cells. *Cancer Res* 1978; 38: 2621.
2. San RHC, et al. DNA repair synthesis of cultured human cells as a rapid bioassay for chemical carcinogens. *Int J Cancer* 1975; 16: 284.
3. Gao FM, et al. Experimental studies on the late effects of female sex hormones. *Science in China (Series B)*, 1990; 33: 311.
4. 蒋左庶. DNA 损伤修复. 国外医学分子生物学分册. 1983; 5: 227.
5. Wattenberg LM, et al. Phenolic antioxidants as Protective agents in Chemical Carcinogenesis. in: Nygaard OF, et al (eds). *Radioprotectors and Anti-Carcinogens*. New York: Academic Press, 1983: 461~469.
6. Turrisi AT, et al. Experience with phase

(下转第17页)

参考文献

1. Shamberger RJ. Genetic toxicology of ascorbic acid. *Mutat Res* 1985; 154: 29.
2. Norppa HT, et al. Chromosomal effect of sodium selenite in vivo. Aberrations and sister-chromatid exchanges in chinese hamster bone marrow. *Hereditas* 1980; 91: 101.
3. Combs Jr GF, et al. Selenium in biology and medicine. New York: AVI Publishing co, 1987: 1060-1073.
4. 曾晓非, 等. 以微核试验为指标研究Vc的抗诱变作用. *工业卫生与职业病* 1991; 17: 11.

5. Shamberger RJ. The genotoxicity of selenium. *Mutat Res* 1984; 133: 135.
6. Guttenplan JB. Mechanisms of inhibition by ascorbate of microbial mutagenesis induced by E-nitroso compounds. *Cancer Res* 1978; 38: 2018.
7. Whiting RF, et al. Unscheduled DNA synthesis and chromosome aberrations induced by organic selenium compounds in the presence of glutathione. *Mutat Res* 1980; 78: 159.
8. Ramel C, et al. Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis. *Mutat Res* 1986; 168: 47.

(continuous with abstracts of the originals)

test in *Vicia faba* root tip cells..... *Yin Muquan, et al*(39)

The study on acute inhaling toxicity and micronuclei test of S2 and its mosquito-repellent incense*Yu Xiuzhen, et al*(42)

The report of using *tradescantia*-stamen hair mutation to test 9 insecticides
.....*Ningzhen Huang, et al*(44)

(上接第32页)

I trails of WR-2721 Preceding radiation therapy. in: Nygaard OF, et al (eds). Radioprotectors and Anticarcinogens. New York: Academic Press, 1983: 681~694.

7. Rander BS, et al. Suppression of x-ray-induced transformation by vitamin E in mouse C3H10T1/2 cells. *Cancer Lett* 1986; 32: 25.
8. 李向高. 人参的抗衰老作用. *中成药研究* 1984; 10: 32.
9. Kadat T, et al. Detection and chemical identification of natural bioantimutagens,

Mutat Res 1985; 150: 127.

10. Zhao BL, et al. Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell Biophysics* 1989; 14: 175.
11. 李媛, 等. 叔丁基羟基茴香醚和苯巴比妥对黄曲霉毒素 B1 诱发的大鼠肝癌前期病变发展过程的影响. *广西医学院学报* 1986; 3: 1.
12. 高凤鸣, 等. γ 线和雌性激素联合诱发细胞转化的分子和自由基机理的研究. 第三届全国自由基生物学与自由基医学学术会议. 厦门. 1991: 36.

(上接第41页)

Environment, part E, Mendelsohn ML and Albertini RJ, eds. New York: Wiley-Liss, Inc. 1990: 1-9.

3. Meier JR. Mutagens in chlorinated water. In: Mutation and Environment, part E, Mendelsohn ML and Albertini, RJ eds, New York: Wiley-Liss Inc. 1990: 11-19.
4. Sandhu SS, et al. Status report of the

international programme on chemical safety's collaborative study on plant test systems. *Mutat Res* 1991; 257(1): 19.

5. Gustaviu FB and Rizzoni M. A mutagenicity analysis of water and sludge of the Tiber river, using the micronucleus test in *Vicia faba* root tip. *Mutat Res* 1991; 252(2): 215.