

## 五加皮的体内抗诱变性研究

刘冰<sup>1</sup> 庞慧民<sup>1</sup> 陈敏怡<sup>2</sup>

<sup>1</sup>白求恩医科大学医学遗传学教研室 长春 130021 <sup>2</sup>上海第二医科大学附属新华医院

**摘要** 本文采用小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验和小鼠精子畸形试验,探讨中药五加皮的体内抗诱变作用。结果表明,五加皮各剂量(1g/kg,2g/kg,4g/kg)对 MMC 诱发的微核率和精子畸形率均有明显的拮抗作用( $P < 0.01$ ),微核抑制率达 50.5% - 73.27%,精子畸形抑制率高达 73.45% - 84%。结果提示,五加皮具有拮抗 MMC 诱发的体细胞和生殖细胞遗传损伤的作用。

**关键词** 五加皮;丝裂霉素 C;微核试验;精子畸形

## STUDY ON THE ANTIMUTAGENIC EFFECT IN VIVO OF CORTEX ACANTHOPANASIA RADICIS

Liu Bing<sup>1</sup>, Pang Huimin<sup>1</sup>, Chen Minyi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Genetics, Norman Bathune University of Medical Sciences, ChangChun 130021

<sup>2</sup>Shanghai Second Medical University, Attached XinHua Hospital

迅速、重复性高的特点。差异显示法用于癌症机理研究的报道很多,主要用于研究两种细胞表达差异基因的比较<sup>(5,6)</sup>。而直接用于手术切除的癌组织报道较少,1995 年 Huang 等率先用差异显示法研究了 20 例癌组织样本中的肝癌相关基因<sup>(7)</sup>。我们将差异显示技术按 Liang P 等首先报道的方法在永生化人胎气管成纤维细胞样品中做了初步研究,建立了该方法;之后又将该方法作了部分改进引入对矿工肺癌组织样品的研究。结果显示,该方法检测矿工肺癌组织和正常肺组织这一对样品时,大部分基因表达基本一致,差异片段数目与文献报道及我们在细胞样品时的差异片段数目相似,大约为 20 - 40 之间。说明差异显示法同样可用于研究同例癌组织和正常组织表达差异的基因。

总之,本实验建立的银染差异显示法,找出了矿工肺癌组织和同例正常肺组织表达差异基因,回收后 PCR 扩增的回收率为 80%。为下一步的实验打下了基础。

### 参考文献

- 1 Liang P, Zhu W, Zhang X, et al. Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Research*, 1994;22:5763
- 2 Hussain SP, Kenney CH, Amstad P, et al. Radon and lung carcinogenesis: mutability of P<sup>53</sup> codons 249 and 250 to <sup>238</sup>Pu alpha-particles of human bronchial epithelial cells. *Carcinogenesis*, 1997;18:121
- 3 杨梅英,叶常青,吴德昌,等. 粒子诱发人胎气管永生化成纤维细胞恶性转化相关基因的分析. *中华放射医学与防护杂志*, 1997; 17:1686
- 4 Hans Georg Simon, Simone Oppenheimer. Advanced mRNA differential display: isolation of a new differentially regulated myosin heavy chain encoding gene in amphibian limb regeneration. *Gene*, 1996; 172:175
- 5 Liang P, Averboukh L, Keyomarsi K, et al. Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res*, 1992;52:6966
- 6 Wang FL, Wang Y, Wong WK, et al. Two differentially expressed genes in normal human prostate tissue and in carcinoma. *Cancer Res*, 1996;56:3634
- 7 Huang LR, Hsu HC. Cloning and expression of CD24 gene in human hepatocellular carcinoma: A potential early tumor marker gene correlates with P<sup>53</sup> mutation and tumor differentiation. *Cancer Res*, 1995; 55:4717

(1998 - 08 - 19 收稿;1998 - 09 - 30 修回)

**Abstract** The antimutagenic effect of *Cortex acanthopanasia Radicis* (CAR) has been studied by mean of micronucleus test of mouse bone marrow polychromatic erythrocyte (PCE) and mouse spermatid malformation test. The results indicated that chinese medicine CAR itself has no genotoxic effect. The inhibition rates of CAR (1g/ kg, 2g/ kg, 4g/ kg) to micronuclei was respectively 73.27%, 50.5% and 63.37% ( $P < 0.01$ ), and inhibition rates of CAR to spermatid malformation was 84% (1g/ kg), 81.45% (2g/ kg) and 73.45% (4g/ kg) ( $P < 0.01$ ). It is suggested that CAR can significantly inhibit the genetic damage of germ cells and stomatic cells induced by MMC.

**Key words** *Cortex acanthopanasia radidis*; mitomycin C(MMC); micronucleus test; sperm aberration

五加皮(*Cortex acanthopanasia radidis*, CAR)是我国传统医学常用的中药,也是民间食疗的重要补品,具有扶正和祛邪兼顾的功能<sup>(1)</sup>。本研究应用小鼠骨髓细胞微核试验(MNT)和精子畸形试验,从体细胞和生殖细胞两方面探讨了中药五加皮的抗诱变作用。

## 材料与amp;方法

1 实验动物 由白求恩医科大学实验动物部提供昆明种小鼠。微核试验:18g - 20g 小鼠,雌雄各半,随机分组,每组 5 只。精子畸形试验:雄性小鼠,体重 25g - 30g,每组 6 只。

2 试剂 丝裂霉素 C(mitomycin C, MMC),日本协和发酵工业株式会社产品,于注射前溶于生理盐水(N.S)。五加皮水提取物,五加皮经粉碎后,称取 20g 粉末,用去离子水 300ml 浸泡 1h,反复煎煮 3 次(第 1 次 30min,后 2 次各 20min),混合 3 次滤液,浓缩至 100ml,每毫升含相当于生药量 200mg。4 保存,使用前以无菌生理盐水稀释到所需浓度。

3 分组及实验方法 实验动物随机分为阴性对照组(N.S);阳性对照组(MMC, 1.0mg/ kg);五加皮诱变试验组(1g/ kg, 2g/ kg, 4g/ kg);五加皮抗诱变组(五加皮 1g/ kg, 2g/ kg, 4g/ kg + MMC)。MMC 为腹腔注射给药,五加皮灌胃给药,每 10g 体重 0.2ml。小鼠骨髓嗜多染红细胞(PCE)微核试验按 Heddle 建议 MNT 方法进行<sup>(2)</sup>,每只动物计数 2 000 个 PCE,求出含微核(MN)的 PCE 的千分率,统计学处理采用  $q$  和  $q$  值法进行率间多重比较。小鼠精子畸形试验,连续给药 5d,抗诱变组 MMC 和五加皮同时给药。

首次给药后 5wk 末,取双侧附睾,按 Wyrobek 方法制片<sup>(3)</sup>。每只动物检查完整精子 1 000 个。精子畸形的类型有无钩、无定形、香蕉形、胖头、双头和双尾。不同畸形的精子分类计数后,计算每组动物精子畸形百分率,统计学处理采用 *Ridit* 检验。

## 结果

### 1 五加皮诱发骨髓细胞微核的观察

五加皮各剂量组的微核率均低于阴性对照组( $P > 0.05$ ),见表 1。证明中药五加皮本身对小鼠体细胞无致突变性。

**Table 1 Induction of MN in mouse bone marrow by CAR**

group	Dose(g/ kg)	Number of MNPCE	Frequency of MN (%)
N.S	-	22	2.2 ±0.57
CAR	1	15	1.5 ±0.35 **
	2	18	1.8 ±0.91 **
	4	13	1.3 ±0.57 **
MMC	1.0	101	10.1 ±4.73

\*\*  $P < 0.01$  compared with MMC

### 2 五加皮诱发小鼠精子畸形的观察

五加皮在本实验所用剂量范围内,小鼠精子畸形率明显少于阴性对照组,差异非常显著( $P < 0.01$ ),三个剂量组之间未观察到剂量反应关系。证明了五加皮本身对小鼠生殖细胞无诱变损伤作用,这与五加皮对小鼠体细胞无诱变性的结果是一致的。见表 2。

**Table 2 Induction of sperms aberration in mice by CAR**

group	Dose (g/ kg)	Nookless	%	Banana shaped	%	Amorphous	%	Bigheaded	%	2tail 2headed	%	total	Frequency of aberration
N. S	-	31	41.58	24	35.29	13	19.12					68	0.011
CAR	1	15	55.56	5	18.52	6	22.22	1	3.70			27	0.0045 **
	2	8	72.72	1	9.09	2	18.18					11	0.0018 **
	4	13	72.2			5	27.8					18	0.003 **
MMC	1.0	113	41.09	40	14.55	55	20	65	23.64	2	0.73	275	0.046

No. of sperms observed: 6 000 \*\*  $P < 0.01$  compared with MMC

**3 五加皮对 MMC 诱发的 PCE 微核率的影响**

MMC 是强诱变剂,能造成染色体的损伤,使 MN 率升高,本实验也同时证明了 MMC 能使小鼠精子畸形明显升高,差异均非常显著 ( $P < 0.01$ )。五加皮与 MMC 同时给药时,可明显降低 MMC 诱发的微核率,差异极其显著 ( $P < 0.01$ ),但各剂量组之间无组间差异 ( $P > 0.05$ ),见表 3。

**Table 3 Influence of CAR on MMC-induced MN**

MMC (mg/ kg)	CAR(g/ kg)	Number of MNPCE	Frequency of MN (%)
N. S	-	22	2.2 ±0.57
1.0	-	101	10.1 ±4.73
1.0	1	27	2.7 ±0.57 **
1.0	2	50	5 ±0.61 **
1.0	4	37	3.7 ±1.44 **

\*\*  $P < 0.01$  compared with MMC

**4 五加皮对 MMC 诱发的小鼠精子畸形率的影响**

如表 4 所示,五加皮各剂量降低 MMC 诱发的精子畸形率有显著性意义 ( $P < 0.01$ )。五加皮两组抗诱变结果趋于一致。

**讨 论**

小鼠骨髓 PCE 微核实验和小鼠精子畸形实验是检测体细胞和生殖细胞遗传学损伤的标准实验,已广泛应用于体内诱变实验和抗诱变实验。现在认为,体内试验的验证结果优于体外测试系统,其中以骨髓细胞 MNT 为最佳<sup>(1)</sup>。然而,遗传信息的传递毕竟是通过生殖细胞来实现的,因此,生殖细胞试验结果又优于体细胞。基于此思路,本研究同时采用 MNT 和精子畸形实验,从体细胞和生殖细胞两方面来分别探讨五加皮的抗诱变作用。

**Table 4 Influence of CAR on MMC-induced sperms aberration**

MMC (mg/ kg)	CAR (g/ kg)	Hookless	%	Banana shaped	%	Amorphous	%	Bigheaded	%	2tail 2headed	%	total	Frequency of aberration
1.0	-	113	41.09	40	14.55	55	20	65	23.64	2	0.73	275	0.046
1.0	1	21	47.73	2	4.55	14	31.82	6	13.64	1	2.27	44	0.0073 **
1.0	2	34	66.67	3	5.88	8	15.69	6	11.76			51	0.0085 **
1.0	4	42	57.53	3	4.11	21	28.77	6	8.22	1	1.37	73	0.012 **

No. of sperms observed: 6000 \*\*  $P < 0.01$  compared with MMC

五加皮(刺五加)为五加科五加属植物的根皮。刺五加的根含多种糖甙,其中有胡萝卜甙醇,7-羟基-6,8-甲氧基香豆精-葡萄糖甙,乙基-半乳糖甙,丁香甙等有效成份。具有败毒抗癌,扶正祛邪之功效。有资料表明,五加皮具有比人参更好的“适应原”样作用,其生物学作用是多方面的,能增强抗体对有害刺激因素的抵抗能力,调节病理过程,且毒性低,具有抗氧化剂作用,能延迟肿瘤的发生和阻止肿瘤的转移<sup>(1,5)</sup>。实验结果证实,五加皮在本实验剂量范围

内,对体细胞和生殖细胞无遗传毒性,尤其值得注意的是,五加皮所致微核率和精子畸形率均少于阴性对照,尤其是精子畸形率,差异非常显著。结果证实,五加皮可以有效抑制自发的微核和精子畸形的产生,同时可以非常明显地抑制 MMC 诱发的微核率和精子畸形率,尤其对精子畸形的抑制效果(73.45% - 84%)优于对微核率的抑制(50.5% - 73.27%,其中小剂量(抑制率 84%)优于中(81.45%)、高(73.45%)剂量。推测,只要使用剂量适当,五加皮可

## 两种新型杀虫剂对蚯蚓精子形态的影响

孔志明 臧宇 沈进萍 罗屿 钟远

南京大学污染控制与资源化研究国家重点实验室 南京大学环境科学与工程系 南京 210093

**摘要** 本文提出了一种检测及评价土壤生态系统中遗传毒性的新方法。赤子爱胜蚓 (*Eisenia foetida*) 经人工土壤法染毒,暴露于不同剂量的两种新型杀虫剂——吡虫啉和抑食肼中,观察它们对蚯蚓精子形态的影响。实验结果表明,吡虫啉在浓度大于 0.5mg/kg 干土时对蚯蚓精子畸变率有明显影响 ( $P < 0.01$ ),并呈现剂量效应关系;而抑食肼在浓度高达 100mg/kg 干土时,与对照组相比才有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

**关键词** 吡虫啉、抑食肼、赤子爱胜蚓;精子形态试验

## EFFECT OF TWO NEW PESTICIDES ON SPERM MORPHOLOGY OF EARTHWORMS (*EISENIA FOETIDA*)

Kong Zhiming, Zang Yu, Shen Jinping, Luo Yu, Zhong Yuan

State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Department of Environmental Science and Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093

**Abstract** In this paper, a new method to assess the environmental safety of pesticide has been proposed in terms of sperm deformity of the earthworm (*Eisenia foetida*). The results showed that the main sperm morphological deformity appeared to be shape changes of the sperm heads. Significant induction of sperm deformity ( $P < 0.01$ ) and dose-effect relationship displayed when the earthworms were exposed to imidacloprid at the concentrations of more than 0.5mg/kg dry soil. However, The sperm deformity frequency of RH-5849-exposed groups did not show significant difference ( $P < 0.05$ ) from the negative control until the dose reached 100 mg/kg dry soil. This study suggests that the detection of sperm abnormality in earthworms could provide an early warning system of polluted environment.

**Key words** Imidacloprid; RH-5849, *Eisenia foetida*; Sperm deformity test

以发挥更好的抗诱变作用,并非剂量与抗诱变作用呈正比,其机理有待进一步探讨。

五加皮的抗诱变作用可能源于五加皮在增强机体抵抗力方面的作用相当广泛,可以使机处于增强非特性防御能力状态。可能五加皮对细胞及对蛋白质、核酸生物合成、DNA 修复过程有某些影响,因此五加皮即可抑制自发的突变也可抑制诱发的突变。提示五加皮可以安全用于体细胞和生殖细胞遗传损伤的防护,阻断环境中致突变物对人体的危害,这对预防某些肿瘤和先天畸形的发生有积极的意义。

### 参考文献

- 1 盛展能主编. 抗癌药论. 第一版. 重庆:重庆出版社,1994; 161-163
- 2 Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity, *Mutat Res*, 1983;123:61
- 3 Wyrobek AJ. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975;72(11):4425
- 4 薛开先. 遗传毒理学讲座. 癌变 畸变 突变,1995;7(2):124
- 5 李纪伟,余瀛鳌,蔡景峰,等. 中医大辞典. 第一版,人民卫生出版社,1995:197-198

(1998-04-06 收稿;1998-08-04 修回)