

用原位缺口翻译法检测细胞 DNA 的损伤 ——灵芝的抗突变作用

何来英 戴寅 卫生部食品卫生监督检验所 (100021)

蔡有余 李革 中国医学科学院实验动物研究所 (100021)

摘要 用原位缺口翻译法检测赤灵芝水提取液对丝裂霉素 C 所致人外周血淋巴细胞 DNA 断裂的影响。结果表明,赤灵芝水提取液有显著的抗突变作用,并呈明显的剂量反应关系,高剂量组能完全抑制丝裂霉素 C 所致的 DNA 断裂。

关键词 原位缺口翻译法 灵芝 抗诱变剂 基因突变

过去几十年中,人们在检测化学物对遗传物质的损伤过程中建立了一系列遗传毒理学研究方法。原位缺口翻译 (In situ nick translation method) 法是近几年建立起来的一种分子生物学方法。我们将此方法应用于遗传毒理学领域,并与经典的染色体畸变、SCE 等方法比较,发现该方法具有更为灵敏、检测结果更为客观可靠等优点。

灵芝是一种具有广泛生物学活性的传统中药,我们过去曾用染色体畸变、SCE、微核实验及 Ames 实验等方法研究过灵芝的抗突变作用,^[1]现将用原位缺口翻译法进行的实验报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

赤灵芝子实体及处理方法见〔1〕

原位缺口翻译试剂盒、E. Coli DNA 聚合酶 I 购自华美生物工程公司。

丝裂霉素 C(MMC) 为 Sigma 产品

37℃, 5% CO₂ 培养 24h 后加入下列试剂: 不同浓度的灵芝液 20 μL(终浓度分别为

10、5、1mg/mL), MMC 10 μL(终浓度为 0.05 μg/mL), 阳性对照组不加灵芝液, 阴性对照组加等量的 RPMI 1640 培养液。继续培养 48h。

1.2.2 原位缺口翻译:^[2] 吸去各孔中上清液, 保留细胞悬液体积约 100 μL, 收集细胞于 1mL 塑料离心管中, 依次加入 dGTP、dCTP、dATP 的等体积混合液 5 μL, 10 × 缓冲液 5 μL, ³H—TdR 5 μL(1mCi/mL), 无菌去离子水 23 μL, 置水浴, 再加入 DNA 聚合酶 I 5 μL, 混匀, 置 15℃ 水浴反应 1h 后加入终止液 5 μL。离心除去未掺入的 ³H—TdR。

1.2.3 液闪测定 将细胞抽滤于 49 型玻璃纤维滤纸上, 依次用蒸馏水 10mL 破细胞, 5% 的三氯醋酸 10mL 去蛋白, 无水乙醇 10mL 固定 DNA, 边加液边抽滤。将滤纸片置闪烁瓶中, 烤干后, 各加闪烁液 5mL, 于 Beckman 液闪仪测定 cpm 值。以 cpm 值表示 ³H—TdR 掺入量, 间接反映 DNA 断裂(缺口)的多少。

对照组 ($P < 0.001$ 或 0.05), 并呈剂量反应关系。适宜剂量的灵芝液能完全抑制 MMC 所致的 DNA 断裂, 并能减少 DNA 的自发断

裂, 其 **cpm** 值显著低于阴性对照组 ($P < 0.05$)。见表。

3 讨论

原位缺口翻译法的基本原理是, DNA 聚合酶 I 能在 DNA 断裂处催化一个核苷酸残基加到缺口的 3'—OH 端, 同时此酶所具有的 5'—3' 外切酶活性将核苷酸从缺口的 5'—磷酸末端切去。一个新的带 3'—OH 端的核苷酸掺入到被切去的核苷酸位置上, 这样缺口就向 3' 末端方向移动了一个核苷酸。这种缺口移动使新核苷酸有序地代替原先被切去的

核苷酸而掺入到 DNA 链中,^[2] 若将加入的四种核苷酸之一用同位素标记, 在液闪仪上测得的 **cpm** 值可以反映新合成的核苷酸量也就是缺口的多少。章静波等^[3] 用原位缺口翻译法检测了培养细胞对致癌物与诱变剂的反应, 其方法是: 经原位缺口反应后, 进行同位素放射自显影, 油镜下记数每个细胞核中的银颗粒数, 以平均每个细胞中银颗粒数表示 DNA 损伤的程度, 是一种半定量方法。我们在此基础上经过修改, 进行液闪测定, 结果更客观定量更准确。

表 灵芝对 MMC 致人外周血淋巴细胞 DNA 断裂的影响

灵芝液 (mg/mL)	10	5	1	0	0
MMC (μg/mL)	0.05	0.05	0.05	0.05	0
cpm 值	2014	3570	5396	5574	2970
	2272	2810	5090	6256	2937
	2251	3249	4343	6454	2915
	2361	3670	4353	7950	3927
$X \pm SD$	2225 ± 148	3333 ± 373	4796 ± 532	6559 ± 1001	3187 ± 494
*P	<0.001	<0.001	<0.05		
**P	<0.05	>0.5	>0.05		

*: 与 MMC 组比较 **: 与空白组比较

本试验结果表明灵芝液有显著的抗突变作用, 此结果与用其它遗传毒理学方法检测的结果一致。^[1] 其中高剂量灵芝组 (10mg/mL) 的 **cpm** 值显著低于阴性对照组的 **cpm** 值, 有以下几种可能的解释: (1) 灵芝能降低 DNA 的自发断裂。正常人培养细胞染色体自发断裂约为 3% ~ 4%,^[4] 而这些在显微镜下见到的染色体断裂还不包括那些只涉及个别基因或碱基对而不表现为染色体形态改变的 DNA 损伤, 因此, 正常人培养细胞存在较高的 DNA 自发断裂。(2) 人外周血细胞体外培养, 会存在一些干扰因素, 如培养液成分、血清中的某些因子, 培养过程中 pH 值、温度等的改变以及某些未知理化因子均可引起 DNA 损伤, 灵芝液有可能拮抗这些干扰因子对 DNA 链的损伤。此提示灵芝可能对多种诱变因子有拮抗作用。

我们将分子生物学方法用于遗传毒理

学, 并在原有的放射自显影半定量方法的基础上经过改进, 建立了一种快速、灵敏、操作简便、测定结果客观可靠的定量检测 DNA 损伤的方法。此方法可以广泛应用于检测环境诱变因子, 食品的遗传毒理学评价, 筛选抗癌物、抗突变物质等, 是一种值得推广的检测方法。

4 参考文献

- 1 何来英, 等. 灵芝的抗突变作用. 中国食品卫生杂志, 1994;6(2):1
- 2 章静波, 郁昌虎. 原位缺口移位技术检测药物对细胞 DNA 的断裂损伤. 细胞生物学杂志, 1991;13(1):44
- 3 章静波, 等. 正常人与 A—T 患者培养细胞对致癌物与诱变剂反应的初步观察. 遗传, 1991;13(5):25
- 4 H.G.Schwarzacher,U.Wolf Springer-Verlag. Methods in Human Cytogenetics.Berling Heidelberg, New York,1974

用原位缺口翻译法检测细胞 DNA 的损伤

——灵芝的抗突变作用——何来英 戴 寅 蔡有余等