

# 应用单细胞凝胶电泳技术评价牛大力的遗传毒性

陈晓白\*, 王晓平, 黄小婷

(玉林师范学院生命科学与技术学院, 广西 玉林 537000)

**[摘要]** **目的:**应用单细胞凝胶电泳技术评价牛大力的遗传毒性。**方法:**40 只小鼠随机分成 5 组:阳性对照组(环磷酰胺组)、阴性对照组(生理盐水组)、牛大力高、中、低( $20, 10, 5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )剂量组。牛大力各剂量组用牛大力煎煮液  $\text{ig}$ , 阴性对照组、阳性对照组  $\text{ig}$  等量生理盐水, 每天 1 次, 连续 10 d, 阳性对照组在最后 2 d  $\text{ip}$  环磷酰胺( $0.08 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 每天 1 次, 在最后 1 次给药 6 h 后, 处死各组小鼠, 取肺、肾、肝、睾丸细胞, 利用单细胞凝胶电泳技术观察牛大力对小鼠肺、肾、肝、睾丸细胞 DNA 的影响。**结果:**牛大力各剂量组对小鼠肺、肾、肝、睾丸细胞的尾部 DNA 百分率(Tail DNA%)和尾矩(Tail Moment)的影响明显低于阳性对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 牛大力高剂量组肾细胞 Tail DNA% 与阴性对照组比明显降低, 统计学上有显著差异( $P < 0.05$ ), 其他各剂量组小鼠细胞 tail DNA% 和 tail moment 与阴性对照组比, 差异无统计学意义。**结论:**牛大力对小鼠肺、肾、肝、睾丸细胞 DNA 未观察到明显损伤。

**[关键词]** 牛大力; 单细胞凝胶电泳; 遗传毒性

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0222-04

## The Evaluation of Genotoxicity on Radix Millettiae Speciosae by Single Cell Gel Electrophoresis

CHEN Xiao-bai\*, WANG Xiao-ping, HUANG Xiao-ting

(College of Life Science and Technology, Yulin Normal University, Yulin 537000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate genotoxicity of Radix Millettiae Speciosae by single cell gel electrophoresis. **Method:** Forty mice were divided into five groups randomly: negative control group, positive control group, and Radix Millettiae Speciosae group with high ( $20 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), middle ( $10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) or low ( $5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) doses. Radix Millettiae Speciosae groups were given with relative drugs, Negative control group and positive control group were given with normal saline by gavage once a day for 10 days, while the last two days, positive control group was injected with cyclophosphamide ( $0.08 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) once a day. In the eleventh day, the mice were sacrificed, DNA damage of liver, kidney, lung, testicular cells was detected by single cell gel electrophoresis. **Result:** Compared with positive control group, tail DNA% and tail moment of liver, kidney, lung, testicular cells in Radix Millettiae Speciosae group had a significant lower reduction ( $P < 0.01$ ). Compared with the negative control group, tail DNA% and tail moment of kidney cells in the Millettiae Speciosae group with high dose showed a significant reduction ( $P < 0.05$ ), tail moment and tail DNA% of their cells in other dose group, no statistically significant difference was found. **Conclusion:** Radix Millettia Speciosa has no damage to mouse cells DNA.

**[Key words]** Radix Millettiae Speciosae; single cell gel electrophoresis; genotoxicity

牛大力(Radix Millettiae Speciosae, RMS)始载

于《生草药性备要》,称大力牛<sup>[1]</sup>,近代本草中多有收载,是《广西中药材标准》(1990年版)收载的地方药材。牛大力来源于豆科崖豆藤属植物美丽崖豆藤的干燥根,习称甜牛大力<sup>[2]</sup>。有补肺滋肾、清热止咳、舒筋活络等功效。主治肺虚咳嗽、咳血、肾虚、腰膝酸痛、遗精、白带、风湿痹痛、跌打损伤、慢性肝

**[收稿日期]** 20111228011

**[基金项目]** 广西自然科学基金面上项目  
(2011GXNSFA018296)

**[通讯作者]** \*陈晓白,副教授,从事药理学教学与科研工作,  
E-mail:ylsy1016@163.com

炎等<sup>[3]</sup>。近年来,随着对牛大力生药学、化学成分、药理作用等方面的深入研究,牛大力的药效得到了进一步的证实,但鲜见有关于牛大力毒性方面的研究报道。本研究采用单细胞凝胶电泳检测技术,在细胞水平上研究牛大力的遗传毒性,为牛大力的安全应用提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 40只昆明种小鼠,SPF级,雄性,体质量(20±2)g,购于广西医科大学医学实验动物中心,许可证号SCXK(桂)2009-0002。

**1.2 药物及试剂** 牛大力购于广西玉林市中药材公司,经陈晓白副教授鉴定为豆科崖豆藤属植物美丽崖豆藤 *Millettia speciosa* Champ 干燥的根;环磷酰胺,江苏恒瑞医药股份有限公司。正常熔点琼脂糖(NMA)、低熔点琼脂糖(LMA)、十二烷基肌氨酸钠(SLS, Sigma公司), Triton X-100、溴化乙啶(EB)染液(Premega公司),二甲亚砜(DMSO)、乙二胺四乙酸二钠(Na<sub>2</sub>EDTA)、三羟甲基氨基甲烷(Tris-base)、氢氧化钠(NaOH)、氯化钠(NaCl)、台盼蓝均为国产分析纯。

**1.3 仪器** DYY-III33A型电泳槽、DYY-12型电泳仪(北京市六一仪器厂),BX51TR-32FB3F01型正置荧光相差生物显微镜(Olympus公司),150万相素CCD(Nikon公司),L420台式低速自动平衡离心机(长江湘仪离心机仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 牛大力煎煮液的制备** 称取一定量的牛大力粉碎,第1次用10倍水浸泡1h,煮沸1h,取出煎煮液;第2次用8倍水煮1h,取出煎煮液;合并2次提取液并浓缩至相当生药2g·mL<sup>-1</sup>,置于4℃冰箱内保存备用,用时加蒸馏水稀释至所需浓度即可。

**2.2 动物分组及处理** 牛大力分组和处理参考文献[4-5]。40只小鼠,随机分为5组,每组8只:阴性对照组(生理盐水组)、阳性对照组(环磷酰胺组)、牛大力高、中、低(20,10,5g·kg<sup>-1</sup>)剂量组。牛大力的剂量相当于成人日用量的48,24,12倍。小鼠购回适应性饲养1周后,剂量组用牛大力煎煮液灌胃,阴性对照组、阳性对照组灌以等量生理盐水,每天1次,连续10d,其中阳性对照组在第9天同时ip环磷酰胺(0.08g·kg<sup>-1</sup>),30h内给药2次,间隔24h。在最后1次给药6h后颈椎脱臼处死各组小鼠,取肺、肾、肝、睾丸细胞(处死前禁食12h,可自由饮水)。

**2.3 小鼠细胞悬液的制备** 颈椎脱臼法处死小鼠,

快速取出肝、肾、肺、睾丸分别放于玻璃平皿内,用预热的37℃的PBS洗2遍,然后用眼科剪剪碎,以一定量的PBS液稀释后,镜头纸过滤,收集细胞液于离心管中,1000r·min<sup>-1</sup>离心5min,弃上清液,将离心管底部细胞重悬浮,将细胞密度调整为1×10<sup>5</sup>~1×10<sup>6</sup>个/mL,在光镜下用台盼蓝法检测活细胞率在95%以上。将制备好的细胞悬液放在4℃的冰箱内保存备用。

**2.4 单细胞凝胶电泳实验** 按参考文献[5]进行,并略加改进。

**2.4.1 制片** 将250μL质量分数为1%的正常熔点琼脂糖浇到预热的全磨沙粗面载玻片(75mm×25mm)上展开,待其固化后取100μL、质量分数为0.8%低熔点琼脂糖和细胞悬液(体积比为5:3)铺在第1层胶上,第2层胶固化后,铺第3层胶(质量分数为0.8%正常熔点琼脂糖100μL)。固化条件均为4℃,10min。

**2.4.2 细胞裂解** 去第3层上的盖玻片,将固化好的凝胶片放入新配置的经预冷的碱性细胞裂解液(2.5mol·L<sup>-1</sup>NaCl,100mmol·L<sup>-1</sup>Na<sub>2</sub>EDTA,10mmol·L<sup>-1</sup>Tris-base,1%十二烷基肌氨酸钠,临用前加终浓度为1%Triton X-100,10%DMSO,pH10.0)中,在4℃冰箱内避光裂解2h。裂解结束后用蒸馏水充分清洗玻片3次,每次5min,以洗去裂解液中高浓度的盐。

**2.4.3 细胞DNA解旋及电泳** 将裂解好的载玻片置于新配制的电泳缓冲液(1mmol·L<sup>-1</sup>Na<sub>2</sub>EDTA,300mmol·L<sup>-1</sup>NaOH,pH13.0)中,室温下调节缓冲液液面高于玻片2mm,避光静置20min,让DNA充分解旋后,于电压19V和电流195mA下电泳20min。全过程均在避光下进行。

**2.4.4 中和、染色和观察** 电泳完毕,将载玻片浸入0.4mol·L<sup>-1</sup>Tris-base缓冲液(pH7.5)中和45min。然后用2mg·L<sup>-1</sup>的EB染色5~10s,迅速用双蒸水洗净,24h内在荧光显微镜下观察。

**2.4.5 拍照与分析** 每只老鼠随机观察50个细胞,由CCD拍摄,用CASP彗星图像分析软件自动分析。分析指标为国际公认的尾部DNA百分率(tail DNA%)和尾矩(tail moment)。其中tail DNA%为单一的彗尾强度指标,tail moment为复合指标,定义为彗尾DNA百分率和彗尾长度的乘积。以上步骤在暗处进行,避免其他原因所致的DNA损伤。

**2.5 数据的统计分析** 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采

用 Origin 7.0 统计分析软件进行数据分析。

### 3 结果

**3.1 牛大力对小鼠细胞尾部 DNA 百分率 (tail DNA%) 的影响** 表 1 数据表明,阳性对照组小鼠各细胞 tail DNA% 明显高于阴性对照组,与阴性对照组比有极显著差异 ( $P < 0.01$ ),说明建模成功,环磷酰胺对小鼠细胞有明显损伤作用。牛大力高剂量组肾细胞 tail DNA% 与阴性对照组比,明显降低,统计学上有显著差异 ( $P < 0.05$ ),其他各剂量组小鼠细胞 tail DNA% 与阴性对照组比,差异无统计学意义,

但与阳性对照组比较,差异极显著 ( $P < 0.01$ ),说明牛大力对小鼠各组织细胞没有损伤作用。

**3.2 牛大力对小鼠细胞尾矩 (tail moment) 的影响** 从表 2 结果看,阳性对照组小鼠各细胞 tail moment 明显高于阴性对照组,与阴性对照组比有极显著差异 ( $P < 0.01$ ),说明建模成功,环磷酰胺对小鼠细胞有明显损伤作用。牛大力各剂量组小鼠细胞 tail moment 与阴性对照组比,差异无统计学意义,但与阳性对照组比较,差异极显著 ( $P < 0.01$ ),说明牛大力对小鼠各组织细胞没有损伤作用。

表 1 牛大力对小鼠细胞 tail DNA 的百分率影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	肝	睾丸	肺	肾
阴性对照	-	4.97 ± 0.53	9.23 ± 0.83	5.24 ± 0.91	5.11 ± 0.68
RMS	5	4.49 ± 0.94 <sup>3)</sup>	9.89 ± 1.99 <sup>3)</sup>	4.97 ± 0.49 <sup>3)</sup>	6.11 ± 1.45 <sup>3)</sup>
	10	3.96 ± 0.49 <sup>3)</sup>	8.97 ± 1.10 <sup>3)</sup>	3.52 ± 0.72 <sup>3)</sup>	5.81 ± 0.42 <sup>3)</sup>
	20	3.09 ± 0.73 <sup>3)</sup>	7.07 ± 1.38 <sup>3)</sup>	3.45 ± 0.65 <sup>3)</sup>	3.18 ± 0.53 <sup>1,3)</sup>
环磷酰胺	0.08	38.43 ± 1.66 <sup>2)</sup>	37.81 ± 2.49 <sup>2)</sup>	31.51 ± 1.80 <sup>2)</sup>	36.63 ± 1.85 <sup>2)</sup>

注:与阴性对照组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与环磷酰胺组比较<sup>3)</sup> $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 牛大力对小鼠细胞 tail moment 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	肝	睾丸	肺	肾
阴性对照	-	0.81 ± 0.15	2.08 ± 0.47	0.85 ± 0.22	0.82 ± 0.25
RMS	5	0.90 ± 0.38 <sup>3)</sup>	3.50 ± 1.68 <sup>3)</sup>	0.72 ± 0.24 <sup>3)</sup>	2.35 ± 0.98 <sup>3)</sup>
RMS	10	0.64 ± 0.27 <sup>3)</sup>	2.09 ± 0.54 <sup>3)</sup>	0.65 ± 0.12 <sup>3)</sup>	0.69 ± 0.08 <sup>3)</sup>
RMS	20	0.47 ± 0.11 <sup>3)</sup>	2.01 ± 0.95 <sup>3)</sup>	0.62 ± 0.18 <sup>3)</sup>	0.36 ± 0.12 <sup>3)</sup>
环磷酰胺	0.08	26.46 ± 1.95 <sup>2)</sup>	19.02 ± 2.23 <sup>2)</sup>	19.73 ± 1.86 <sup>2)</sup>	19.82 ± 1.80 <sup>2)</sup>

### 4 讨论

单细胞凝胶电泳 (single cell gelelectrophoresis assay, SCGE), 又称彗星实验 (cometay)。是最先由 Ostling 和 Johanson<sup>[6]</sup> 于 1984 年提出,后来经过 Singh 等<sup>[7]</sup> 改进用于检测有核细胞 DNA 损伤的技术,可在单个细胞水平上检测 DNA 损伤和修复。其原理主要是细胞裂解及 DNA 解旋后,在电泳过程中,断裂的 DNA 碎片会因携带负电荷而向阳极移动,未解旋的 DNA 在原位不动,经溴化乙锭染色后,核在原位形成一个明亮的头部,断裂的 DNA 形成扫把状的彗星。损伤越严重,碎片越多,形成的尾部也越长<sup>[8]</sup>。单细胞凝胶电泳技术具有能快速检测、灵敏度高和方法操作简单方便、无须放射物标记等优点,因此被广泛应用于生物学、毒理学、DNA 的断裂和修复、环境生物检测、药物筛选以及肿瘤、衰老、凋亡机制的研究,是遗传毒理学中检测 DNA 损伤的经典方法。

性,因此,采用单细胞凝胶电泳这种快速且灵敏度高的技术能更好地从细胞水平评价牛大力的遗传毒性。从实验结果看,牛大力各剂量组对小鼠肺、肾、肝、睾丸细胞的 tail DNA% 和 tail moment 的影响明显低于已证实有致突变性的阳性对照物环磷酰胺,差异有极显著的统计学意义 ( $P < 0.01$ ),牛大力高剂量组肾细胞 tail DNA% 与阴性对照组比,明显降低,统计学上有显著差异 ( $P < 0.05$ ),其他各剂量组小鼠细胞 tail DNA% 和 tail moment 与阴性对照组比,差异无统计学意义。以上结果表明,牛大力在此用药范围内对小鼠组织细胞 DAN 未见明显损伤。

牛大力应用历史悠久,作为药食同源的珍贵药材越来越受到人们的关注。本研究为牛大力的临床应用和食疗用药提供了安全使用的理论依据。

研究药物遗传毒性的方法有多种,单细胞凝胶电泳技术只是从一个侧面检测牛大力的遗传毒性,为了更明确牛大力的遗传毒性,还有待于进一步深入研究。

# 心脉隆胶囊对高脂血症大鼠的调脂作用及对肝脂的影响

肖芬, 吴建新\*, 任海花

(大理学院药学院, 云南 大理 671000)

**[摘要]** **目的:** 观察心脉隆胶囊(XMLJ)对高脂血症大鼠血脂及肝脂的治疗作用。**方法:** 一次性 ip 维生素 D  $6 \times 10^5$  U·kg<sup>-1</sup>, 喂食高脂饲料 4 周建立大鼠高脂血症模型。建模后用不同剂量(450, 300, 150 mg·kg<sup>-1</sup>)的 XMLJ ig 治疗 4 周, 测定大鼠血清血脂含量、过氧化损伤及内皮损伤程度, 观察肝组织病理改变。**结果:** XMLJ 各剂量均能降低总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、丙二醛(MDA)、内皮素-1(ET-1)、血栓素 B<sub>2</sub>(TXB<sub>2</sub>)含量, 升高高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、一氧化氮(NO)、前列环素(PGI<sub>2</sub>)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活力( $P < 0.05$ ), 肝组织损伤减轻。**结论:** XMLJ 能调节高脂血症大鼠血脂水平, 提高机体抗氧化损伤能力, 改善血管内皮功能, 减轻肝脏脂肪变性程度。

**[关键词]** 心脉隆胶囊; 高脂血症; 肝组织病理变化; 过氧化; 内皮损伤

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0225-04

## The Effects of Xinmailong Capsules on Blood Lipid Level and Hepatic Lipid in Rats with Hyperlipemia

XIAO Fen, WU Jian-xin\*, REN Hai-hua

(Department of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of Xinmailong capsules (XMLJ) on the blood lipid and hepatic tissue in the rats with hyperlipidemia. **Method:** The hyperlipidemia model was established by injected intraperitoneally (ip) vitamin D  $6 \times 10^5$  IU·kg<sup>-1</sup> at once and given high fat forage for four weeks. Then modeling rats were treated with different doses of XMLJ (450, 300, 150 mg·kg<sup>-1</sup>), and four weeks later, the levels of blood lipid were measured, the degree of peroxide and endothelium injury were observed, including the hepatic tissue pathology. **Result:** The total cholesterol (TC), triglyeeride (TG), low density lipoprotein-cholesterol

**[收稿日期]** 20111108(005)

**[基金项目]** 云南省腾冲制药厂开发研究项目(2010TY0910)

**[通讯作者]** \* 吴建新, Tel:0872-2257104, E-mail:wujianxin58@163.com

### [参考文献]

- [1] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准[S]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1992: 31.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(40卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 136.
- [3] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 571.
- [4] 周添浓, 刘丹丹, 唐立海, 等. 牛大力对四氯化碳及酒精所致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(10): 2585.
- [5] 王晓平, 黄翔, 段丽菊, 等. 五指毛桃水提液对辐射致小鼠肺细胞 DNA 损伤的保护作用研究[J]. 中国药

房, 2011, 22(3): 201.

- [6] Osfling O, Johanson K J. Microelectrophoretic study of radiation-induce DNA damage in individual mammalian cell [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1984, 123: 291.
- [7] Olive PL. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis [J]. Cancer Res, 1991, 51(17): 4671.
- [8] 陈玮琳. 快速敏感检测 DNA 断裂的方法——彗星试验[J]. 国外医学: 卫生学分册, 1998, 25(2): 101.

[责任编辑 聂淑琴]