

葛根素的抗诱变性

邹思颖¹, 张立实^{2*}¹四川省疾病预防控制中心; ²四川大学华西公共卫生学院, 成都 610041

摘要: 检测和评价葛根素的抗诱变性, 为其开发应用提供依据。采用小鼠淋巴瘤细胞实验评价葛根素抗诱变性。抗诱变性检测采用前处理、同时处理和后处理三种处理方式, 以观察葛根素对甲基磺酸甲酯(MMS)或丝裂霉素 C(MMC)诱变性的拮抗作用。结果显示, 在葛根素抗诱变性检测中, MMS 做为诱变剂时, 在三种处理条件下, 葛根素各剂量组 *tk* 位点总突变频率显著低于 MMC 阳性对照组 ($P < 0.01$)。MMC 做为诱变剂时, 在三种处理条件下, 与 MMC 阳性对照组比较, 葛根素各剂量组 *tk* 位点总突变频率均降低 ($P < 0.01$)。实验结果表明在三种处理条件下, 葛根素能有效地抑制 MMS 和 MMC 的诱变作用, 以前处理方式的抑制作用最强。

关键词: 葛根素; 小鼠淋巴瘤细胞实验; 抗诱变

中图分类号: R285

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.3.013

Antimutagenic Effect of Puerarin

ZOU Si-ying¹, ZHANG Li-shi^{2*}¹Sichuan Center for Disease Control and Prevention; ²West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Abstract: In this study, the antimutagenic effect of puerarin were determined by TK gene mutation assay in L5178Y cells. Determination of mutant frequency of *tk* locus was performed according to the microcell method. The results showed that puerarin significantly inhibited the mutagenic effects of MMS and MMC in the pre-, post- and simultaneous treatments. Puerarin showed a good role for preventing TK gene mutation induced by MMS or MMC.

Key words: puerarin; mouse lymphoma assay; antimutagenicity

葛根素主要从葛根中提取, 是葛根中特有且含量最高的黄酮类化合物^[1,2]。葛根在亚洲是常用的传统药物, 含葛根素、皂角苷、三萜类化合物和生物碱等多种成分, 其中葛根素是葛根的主要有效成分之一^[2]。葛根素已被制成多种剂型如片剂、注射剂、胶囊、丸和滴眼液等, 广泛用于治疗心脑血管疾病, 视网膜静脉阻塞, 突发性耳聋, 糖尿病等^[3]。研究表明, 葛根素还有较好的抗癌作用, 能通过降低肿瘤细胞活力和诱导细胞凋亡而抑制癌细胞的生长^[4,5]。

小鼠淋巴瘤细胞实验是一种用于初筛诱变剂和致癌物质的体外实验, 以胸苷激酶(TK)基因突变做为检测终点, 评估化学物对TK基因的诱变作用, 从而评价被检化合物的诱变性^[6]。目前常用于检测化合物抗诱变性的实验有: Ames实验、彗星实验、微核试验、HPRT基因突变实验、染色体畸变实验等

等, 由于这些实验的检测终点不同, 且一般仅能检测到单一的遗传毒性效应, 可能造成假阴性结果, 故通常需要一组实验以全面评价受试物的遗传毒性。小鼠淋巴瘤细胞实验不仅可以检测出小缺失、点突变、重组等小范围的基因突变, 还能检测出包括TK位点在内的大的缺失、染色体畸变等大范围的遗传损伤^[7,8], 因此将小鼠淋巴瘤细胞实验用于诱变性和抗诱变性检测具有高灵敏性、检测范围广等优点。目前关于小鼠淋巴瘤细胞实验用于化学物的抗诱变性评价的研究报道尚不多见。本研究利用小鼠淋巴瘤细胞实验检测葛根素的抗诱变性, 一方面为其开发和利用提供依据, 另一方面也将为小鼠淋巴瘤细胞试验应用于抗诱变性检测累积更多的资料。

1 材料与方法

1.1 细胞系和细胞培养

L5178Y 3.7.2C *tk*^{+/-}细胞, 由日本国立研究所本间正充提供。使用RPMI1640培养液(含10%马血清, 200 μg/mL丙酮酸钠, 100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素)于37℃, 5% CO₂培养条件下培养。

收稿日期: 2015-07-20

接受日期: 2015-12-28

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重大项目(2006BAD27 B08)

* 通讯作者 E-mail: lishizhang_56@163.com

1.2 受试物

葛根素购于成都市药品生物制品研究所。使用时用二甲基亚砜(DMSO)将其溶解成不同浓度溶液。

1.3 试剂

甲基磺酸甲酯(MMS),丝裂霉素 C(MMC), RPMI1640 培养基,马血清,三氟胸苷(TFT),丙酮酸钠,二甲基亚砜,胸腺嘧啶核苷(T),次黄嘌呤(H),甘氨酸(G),甲氨蝶呤(M)等均购于 Sigma 公司。

1.4 剂量设计

预实验中,MMC 与葛根素同时作用 L5178Y 细胞 3h 确定实验剂量。当葛根素为 50 (g/mL 时,相对悬浮生长率(RSG)较小,在 45%~48% 之间,表现出明显细胞毒性;因为考虑在多数情况下,相对悬浮生长率(RSG) > 相对存活率(RS),上述处理情况下的 RS 可能在 10%~20% 的理想范围内,因此葛根素正式实验的剂量定为 6.25、12.5、25、50 (g/mL,另外再设一个阳性诱变对照(MMS 5 (g/mL 或 MMC 0.5 (g/mL),溶剂对照(0.5% DMSO)和阴性对照(纯水)以及抗诱变阳性对照(VitC 100 (g/mL + MMS 5 (g/mL 或 MMC 0.5 (g/mL)。

1.5 清除自发突变

用含 THMG 的 1640 培养液处理 L5178Y 细胞 24 h 后再用含 THG 的 1640 液培养 48 h^[9]。

1.6 受试物处理细胞

将 L5178Y 细胞调至 2×10^5 /mL,每瓶 5 mL。采用前处理、同时处理和后处理三种处理方式,按 1% 加入不同浓度葛根素和 MMS 或 MMC。处理结束后,1000 rpm 离心 10 min,弃上清液,用 PBS 缓冲液洗涤细胞两次,重新悬浮细胞于含 10% 马血清的 RPMI1640 培养液中,并调整细胞密度到 2×10^5 /mL。

1.7 平板接种效率(PE₀、PE₂)测定

将 1.6 中细胞梯度稀释至 8 个/mL,按每孔 200 (L 接种 96 孔培养板,每个剂量接种 1 块平板。于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 14 d 后,计数每块培养板有集落生长的孔数,计算第 0 d 的平板接种效率(PE₀)。1.6 中剩余细胞继续表达培养 2 d,表达培养结束后,按上述 PE₀ 方法测定 PE₂。

1.8 表达培养

将 1.6 中的剩余细胞调整细胞密度为 2×10^5 /mL,表达培养 2 d,同时每隔 24 h 计数,并调整细胞密度为 2×10^5 /mL,计算相对悬浮生长率(RSG)。

1.9 突变频率(TMf)测定

取经表达培养 2 d 的细胞,将细胞密度调整为 1×10^4 ,按 1% 加入 100 × TFT,使其终浓度为 3 (g/mL,然后将细胞悬液加到 96 孔板中,每孔加 200 (L,即每孔有 2000 个细胞。每个剂量组做两个平行,在 5% CO₂、37 °C 饱和湿度培养箱中培养 12 d 后,肉眼计数每块平板的集落生长孔数。

1.10 数据计算及统计分析

PE₀ 和 PE₂ (第 0 d、2 d 平板效率)、RS (相对存活率)、RSG、RTG (相对总生长率)、TMf (总突变频率)等计算方法和结果判定标准参照文献^[9]。使用 Mutant TM 软件对实验结果进行统计分析。

2 实验结果

MMS 做为诱变剂时,在前处理条件下,葛根素各剂量组与 MMC 阳性对照组比较 TMf 降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),同时葛根素 12.5、25 和 50 μg/mL 各剂量组 TMf 低于 VitC + MMS 组,差异有统计学意义($P < 0.01$);在同时处理条件下,葛根素各剂量组与 MMS 阳性对照组比较 TMf 降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),同时葛根素 25 和 50 μg/mL 剂量组 TMf 低于 VitC + MMS 组,差异有统计学意义($P < 0.01$);在后处理条件下,葛根素各剂量组与 MMS 阳性对照组比较 TMf 降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),同时葛根素 50 μg/mL 剂量组 TMf 低于 VitC + MMS 组,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1-3,图 1。

MMC 做为诱变剂时,在前处理条件下,葛根素各剂量组与 MMC 阳性对照组比较 TMf 降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),同时葛根素 25 和 50 μg/mL 剂量组 TMf 低于 VitC + MMC 组,差异有统计学意义($P < 0.01$);在同时处理和后处理条件下,葛根素各剂量组与 MMC 阳性对照组比较 TMf 降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),同时葛根素 50 μg/mL 剂量组 TMf 低于 VitC + MMC 组,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 4-6,图 2。

3 讨论与结论

本实验中,MMS 和 MMC 两种具有不同遗传毒性机制的诱变剂被用于研究葛根素对不同遗传突变的抗突变作用。MMS 是一种直接烷化剂,主要是使嘌呤碱基的氮原子甲基化,导致碱基不稳定,进而导致染色体重排或重组^[10,11]。MMC 是一种双功

能烷化剂和交联剂,能与脱氧鸟苷碱基形成加合物,因为 MMS 和 MMC 可以导致多种诱变效应,故被广泛诱导产生姐妹染色单体交换和染色体畸变^[12,13]。泛用作诱变性检测的阳性对照物。

表 1 葛根素前处理时对 MMS 诱变性的影响

Table 1 Detection results of antimutagenicity of puerarin in pre-treatment while MMS as mutagen

Group	RS (%)	RSG (%)	RTG (%)	TMF ($\times 10^{-6}$)
Negative	100.00	100.00	100.00	78.51 ^{#&}
DMSO	80.08	87.16	69.80	90.96 ^{#&}
6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ P + MMS	58.29	72.99	42.54	154.63 ^{*#}
12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ P + MMS	53.53	71.25	38.14	115.27 [#]
25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ P + MMS	47.75	65.23	31.15	106.45 [#]
50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ P + MMS	41.26	59.04	24.36	97.46 [#]
VitC + MMS	49.15	55.64	27.34	177.34 ^{*#}
MMS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	24.33	49.78	12.11	418.87 ^{*&}

注:与溶剂对照组比较,^{*} $P < 0.01$,与 MMS 阳性对照组比较,[#] $P < 0.01$,与 VitC + MMS 组比较,[&] $P < 0.01$,P:葛根素。

Note:compared with the solvent control group,^{*} $P < 0.01$;compared with the MMS positive control group,[#] $P < 0.01$;compared with the VitC + MMS group,[&] $P < 0.01$,P:puerarin.

表 2 葛根素同时处理时对 MMS 诱变性的影响

Table 2 Detection results of antimutagenicity of puerarin in simultaneous- treatment while MMS as mutagen

Group	RS (%)	RSG (%)	RTG (%)	TMF ($\times 10^{-6}$)
Negative	100.00	100.00	100.00	76.59 ^{#&}
DMSO	81.07	85.89	69.63	94.47 ^{#&}
6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ P + MMS	57.60	71.93	41.43	189.74 ^{*#}
12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ P + MMS	51.33	70.21	36.04	174.22 ^{*#}
25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ P + MMS	46.99	64.28	30.21	149.57 [#]
50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ P + MMS	35.46	58.18	20.63	129.15 [#]
VitC + MMS	45.61	54.83	25.01	181.93 ^{*#}
MMS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	21.73	49.06	10.66	396.67 ^{*&}

注:与溶剂对照组比较,^{*} $P < 0.01$,与 MMS 阳性对照组比较,[#] $P < 0.01$,与 VitC + MMS 组比较,[&] $P < 0.01$,P:葛根素。

Note:compared with the solvent control group,^{*} $P < 0.01$;compared with the MMS positive control group,[#] $P < 0.01$;compared with the VitC + MMS group,[&] $P < 0.01$,P:puerarin.

表 3 葛根素后处理时对 MMS 诱变性的影响

Table 3 Detection results of antimutagenicity of puerarin in post-treatment while MMS as mutagen

Group	RS (%)	RSG (%)	RTG (%)	TMF ($\times 10^{-6}$)
Negative	100.00	100.00	100.00	65.94 ^{#&}
DMSO	80.64	86.44	69.70	81.78 ^{#&}
6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ P + MMS	52.52	71.47	37.54	195.25 ^{*#}
12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ P + MMS	48.16	66.45	32.00	186.96 ^{*#}
25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ P + MMS	42.78	62.10	26.57	167.94 ^{*#}
50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ P + MMS	33.27	53.92	17.94	146.11 ^{#&}
VitC + MMS	45.42	52.60	23.89	191.48 ^{*#}
MMS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	22.20	51.94	11.53	419.49 ^{*&}

注:与溶剂对照组比较,^{*} $P < 0.01$,与 MMS 阳性对照组比较,[#] $P < 0.01$,与 VitC + MMS 组比较,[&] $P < 0.01$,P:葛根素。

Note:compared with the solvent control group,^{*} $P < 0.01$;compared with the MMS positive control group,[#] $P < 0.01$;compared with the VitC + MMS group,[&] $P < 0.01$,P:puerarin.

表4 葛根素前处理时对 MMC 诱变性的影响

Table 4 Detection results of antimutagenicity of puerarin in pre-treatment while MMC as mutagen

Group	RS(%)	RSG(%)	RTG(%)	TMF($\times 10^{-6}$)
Negative	100.00	100.00	100.00	72.36 ^{#&}
DMSO	88.97	85.35	75.94	81.33 ^{#&}
6.25 $\mu\text{g/mL}$ P + MMC	33.70	76.59	25.81	321.64 ^{*#}
12.5 $\mu\text{g/mL}$ P + MMC	24.54	68.57	16.83	238.47 ^{*#}
25 $\mu\text{g/mL}$ P + MMC	19.35	65.37	12.65	198.36 ^{*#}
50 $\mu\text{g/mL}$ P + MMC	18.35	56.35	10.34	137.97 ^{*#}
VitC + MMC	32.50	62.38	20.27	277.30 ^{*#}
MMC (0.5 $\mu\text{g/mL}$)	9.92	31.64	3.14	729.10 ^{*&}

注:与溶剂对照组比较,^{*} $P < 0.01$,与 MMC 阳性对照组比较,[#] $P < 0.01$,与 VitC + MMC 组比较,[&] $P < 0.01$ 。P:葛根素。

Note:compared with the solvent control group,^{*} $P < 0.01$;compared with the MMS positive control group,[#] $P < 0.01$;compared with the VitC + MMS group,[&] $P < 0.01$ 。P:puerarin.

表5 葛根素同时处理时对 MMC 诱变性的影响

Table 5 Detection results of antimutagenicity of puerarin in simultaneous treatment while MMC as mutagen

Group	RS(%)	RSG(%)	RTG(%)	TMF($\times 10^{-6}$)
Negative	100.00	100.00	100.00	63.48 ^{#&}
DMSO	83.90	84.09	70.55	91.84 ^{#&}
6.25 $\mu\text{g/mL}$ P + MMC	22.78	75.34	17.17	338.21 ^{*#}
12.5 $\mu\text{g/mL}$ P + MMC	16.85	67.93	11.45	317.48 ^{*#}
25 $\mu\text{g/mL}$ P + MMC	15.91	64.21	10.22	295.07 ^{*#}
50 $\mu\text{g/mL}$ P + MMC	14.98	54.09	8.10	206.08 ^{*#}
VitC + MMC	27.03	64.80	17.51	297.85 ^{*#}
MMC (0.5 $\mu\text{g/mL}$)	9.63	31.39	3.02	693.96 ^{*&}

注:与溶剂对照组比较,^{*} $P < 0.01$,与 MMC 阳性对照组比较,[#] $P < 0.01$,与 VitC + MMC 组比较,[&] $P < 0.01$ 。P:葛根素。

Note:compared with the solvent control group,^{*} $P < 0.01$;compared with the MMS positive control group,[#] $P < 0.01$;compared with the VitC + MMS group,[&] $P < 0.01$ 。P:puerarin.

表6 葛根素后处理时对 MMC 的诱变性的影响

Table 6 Detection results of antimutagenicity of puerarin in post-treatment while MMC as mutagen

Group	RS(%)	RSG(%)	RTG(%)	TMF($\times 10^{-6}$)
Negative	100.00	100.00	100.00	73.22 ^{#&}
DMSO	81.87	82.00	67.14	89.43 ^{#&}
6.25 $\mu\text{g/mL}$ P + MMC	21.84	73.72	16.10	384.55 ^{*#}
12.5 $\mu\text{g/mL}$ P + MMC	16.25	64.54	10.49	354.11 ^{*#}
25 $\mu\text{g/mL}$ P + MMC	13.30	60.60	8.06	337.69 ^{*#}
50 $\mu\text{g/mL}$ P + MMC	11.88	52.82	6.28	274.64 ^{*#}
VitC + MMC	15.50	64.42	9.98	338.42 ^{*#}
MMC (0.5 $\mu\text{g/mL}$)	9.15	31.62	2.89	713.69 ^{*&}

注:与溶剂对照组比较,^{*} $P < 0.01$,与 MMC 阳性对照组比较,[#] $P < 0.01$,与 VitC + MMC 组比较,[&] $P < 0.01$ 。P:葛根素。

Note:compared with the solvent control group,^{*} $P < 0.01$;compared with the MMS positive control group,[#] $P < 0.01$;compared with the VitC + MMS group,[&] $P < 0.01$ 。P:puerarin.

根据加入诱变剂的顺序,一般认为抗诱变实验可以分为三种类型:前处理、同时处理和后处理。前处理和后处理实验结果为阳性时,可认为受试物属

于生物抗诱变剂,而同时处理实验结果为阳性时,则可认为受试物属于去诱变剂^[14]。本课题检测葛根素的抗诱变性时也使用了前处理、同时处理和后处

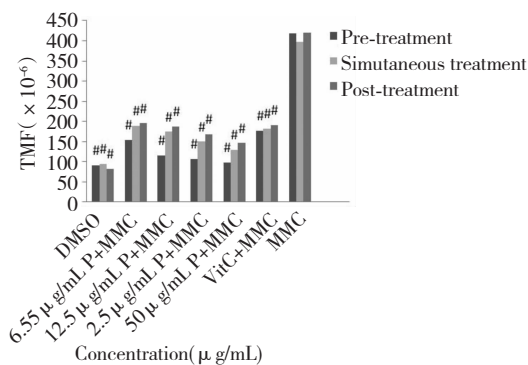


图1 三种处理条件下葛根素对 MMS 的抗诱变性作用

Fig. 1 Comparison of the effect of puerarin on TMF induced by MMS in three treatments

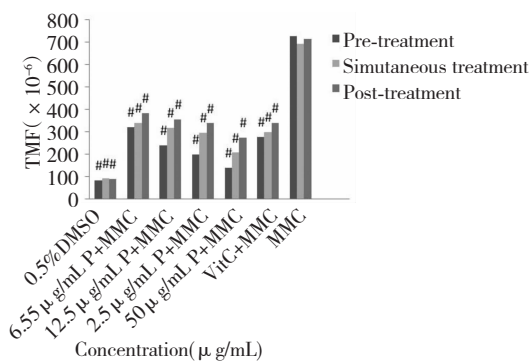


图2 三种处理条件下葛根素对 MMC 的抗诱变性作用

Fig. 2 Comparison of the effect of puerarin on TMF induced by MMC in three treatments

理三种方式,以初步探讨葛根素抗诱变性作用机制。

本研究结果表明,在三种处理条件下葛根素各剂量组均能拮抗 MMS 和 MMC 的诱变作用,表明葛根素具有较好的抗诱变作用。而葛根素在前处理条件下抗诱变作用最强,可能与葛根素预孵细胞后可增强其抗氧化酶作用有关。目前有关葛根素的抗诱变作用研究尚不多见,但是已有较多研究发现葛根素具有抗癌作用。2006 年 Yu Z 和 Li W 通过 MTT 实验发现葛根素可以抑制 HT-29 结肠癌细胞增殖,当其浓度 $\geq 25 \mu\text{M}$ 时可诱导 HT-29 细胞凋亡^[15]。2009 年 Lin YJ 等发现葛根异黄酮及其代谢产物可以通过诱导乳腺肿瘤细胞凋亡从而达到抑制肿瘤细胞生长的作用^[4]。本实验中,在三种处理条件下,葛根素(6.25 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)均能拮抗 MMS 和 MMC 的诱变性且前处理的抗诱变作用较强,提示可能是因为受试物预孵细胞后可增强其某些具有清除自由基功能的酶的功能。

参考文献

- 1 Reppert A, Yousef GG, Rogers RB, *et al.* Isolation of radiolabeled isoflavones from kudzu (*Pueraria lobata*) root cultures. *J Agric Food Chem*, 2008, 56: 7860-7865.
- 2 Barnes S. The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products. *Lymphat Res Biol*, 2010, 8(1): 89-98.
- 3 Benlhabib E, Baker JI, Keyler DE, *et al.* Effects of purified puerarin on voluntary alcohol intake and alcohol withdrawal symptoms in P rats receiving free access to water and alcohol. *J Med Food*, 2004, 7: 180-186.
- 4 Lin YJ, Hou YC, Lin CH, *et al.* Puerariae radix isoflavones and their metabolites inhibit growth and induce apoptosis in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 378: 683-688.
- 5 Yanagihara K, Ito A, Toge T, *et al.* Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Res*, 1993, 53: 5815-5821.
- 6 Clive D, Flamm WG, Machesko MR, *et al.* A mutation assay system using the thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells. *Mutation Res*, 1972, 16: 77-87.
- 7 Wang J, Sawyer JR, Chen L, *et al.* The mouse lymphoma assay detects recombination, deletion, and aneuploidy. *Toxicol Sci*, 2009, 109: 96-105.
- 8 Beranek DT. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation Res*, 1990, 231: 11-30.
- 9 Clements J. The mouse lymphoma assay. *Mutat Res*, 2000, 455(1-2): 97-110.
- 10 Wyatt MD, Pittman DL. Methylating agents and DNA repair responses; methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol*, 2006, 19: 1580-1594.
- 11 Grzesiuk E. The role of mutation frequency decline and SOS repair systems in methyl methanesulfonate mutagenesis. *Acta Biochim Pol*, 1998, 45: 523-533.
- 12 Latt SA. Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair; detection by fluorescence and induction by mitomycin C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, 71: 3162-3166.
- 13 Tomasz M, Lipman R, Chowdary D, *et al.* Isolation and structure of a covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA. *Science*, 1987, 235: 1204-1208.
- 14 Kada T, Shimoi K. Desmutagens and bio-antimutagens—their modes of action. *Bioessays*, 1987, 7: 113-116.
- 15 Yu Z, Li W. Induction of apoptosis by puerarin in colon cancer HT-29 cells. *Cancer Lett*, 2006, 238: 53-60.