

蓖麻毒素和凝集素 LD₅₀ 值的简易测定法

詹金彪 周佩珩

(浙江医科大学生化教研室, 杭州 310006)

提 要

本文介绍了一种蓖麻毒素和凝集素 LD₅₀ 测定的新方法。与经典 LD₅₀ 测定法比较, 该法简易、经济、快速, 结果可靠, 特别适用于蓖麻毒素和凝集素这类作用慢、毒性强的毒蛋白的急性毒性试验。

关键词 蓖麻毒素, 蓖麻凝集素, LD₅₀ 测定法

一个样本的毒性常用动物试验来决定。半数致死剂量 (LD₅₀) 已成为标志毒性强度的重要常数。但实际上 LD₅₀ 值受到各种因素的影响, 如动物特性、实验条件、给药途经、用药量、观察时间以及计算方法等^[1]。经典 LD₅₀ 测定法很多, 但这些方法都要使用大量的动物, 而得到的 LD₅₀ 值, 由于受上述因素的影响, 不可能很精确。1979 年, Molinengo^[2] 在 Beccari^[3] 的基础上作了改进, 提出了一种简易 LD₅₀ 测定法, 并比较了多种药物的经典法和简易法 LD₅₀ 值, 获得了可靠的结论。最近, Meier 和 Theakston^[4] 用这种方法来测定蛇毒的 LD₅₀ 值。本文作者用这种方法来测定蓖麻毒素和凝集素的 LD₅₀ 值, 其结果报告如下。

材 料 与 方 法

一、材料与试剂

1. NIH 小白鼠由浙医大动物科提供。
2. 蓖麻毒素和凝集素按文献[5]制备。

二、操作方法

1. 取健康 NIH 小白鼠, 雌(未孕)雄各半, 体重 20—24g, 随机编号。
2. 用灭菌生理盐水配制一系列不同浓度的样品溶液。
3. 各小鼠腹腔内分别注射不同浓度的样品

溶液, 并逐一记录注射时间。

4. 在正常饲养条件下, 记录各鼠死亡时间, 精确至 5min。

5. 以死亡时间与注射时间两项, 求出各鼠的存活时间。

6. 根据文献[4]方法, 列出各种剂量(D)下小鼠的存活时间(T), 并求出相应的比值 D/T 。根据 Molinengo 的改进法^[2], D 与 D/T 之间存在线性关系。把 D 与相应的 D/T 各点进行直线回归和统计处理, 即可求得 LD₅₀ 值及其相应的标准差 (SD) 和可信区间。

结 果 与 处 理

一、蓖麻毒素的 LD₅₀ 值

取 5 和 10 只两组小鼠, 腹腔注射各种剂量 (D) 的蓖麻毒素后, 相应的存活时间 T 及 D/T 值列于表 1。统计计算步骤和结果列于表 2。以 D 为纵轴, D/T 值为横轴, 得到回归直线在纵轴的截距即为 LD₅₀ 值(图 1、2)。用 5 只小鼠求得的 LD₅₀ = b = 14.92 μ g/kg, SD = 12.90 μ g/kg, 求得的 SD 数值偏大; 用 10 只小鼠, 可求得 LD₅₀ = 36.27 μ g/kg, SD 为 5.17 μ g/kg, 其 95% 可信区间可由下式求得:

$$\beta = b \pm t_{1-\alpha/2} \cdot SD_b \cdot \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{L_{xx}}}$$

表1 腹腔注射蓖麻毒素和凝集素后小鼠存活时间

样品	动物组号	动物编号	剂量 D ($\mu\text{g/kg}$)	存活时间 T (h)	剂量/存活时间 D/T ($\mu\text{g/kg} \cdot \text{h}$)
蓖麻毒素	1	1	75	27.02	2.776
		2	87.5	22.35	3.915
		3	125	24.02	5.204
		4	150	20.32	7.381
		5	200	22.76	8.787
	2	1	75	21.90	3.43
		2	87.5	23.86	3.67
		3	100	21.52	4.65
		4	125	15.46	8.09
		5	150	14.54	10.32
蓖麻凝集素	1	6	175	16.63	10.52
		7	200	14.48	13.81
		8	225	13.75	16.36
		9	250	15.28	16.36
		10	500	13.17	37.97
		1	4.0×10^3	10.88	0.37×10^3
		2	4.5×10^3	9.47	0.48×10^3
		3	5.0×10^3	10.45	0.48×10^3
		4	6.0×10^3	9.21	0.65×10^3
		5	6.5×10^3	10.98	0.59×10^3
		6	8.0×10^3	10.78	0.74×10^3
		7	10.0×10^3	9.83	1.02×10^3
		8	12.0×10^3	9.76	1.23×10^3
		9	14.0×10^3	9.24	1.52×10^3
		10	18.0×10^3	8.31	2.17×10^3

$= 36.27 \pm 6.17 \mu\text{g/kg}$

二、蓖麻凝集素 LD₅₀ 测定

取 10 只小鼠，其注射各种剂量凝集素后，

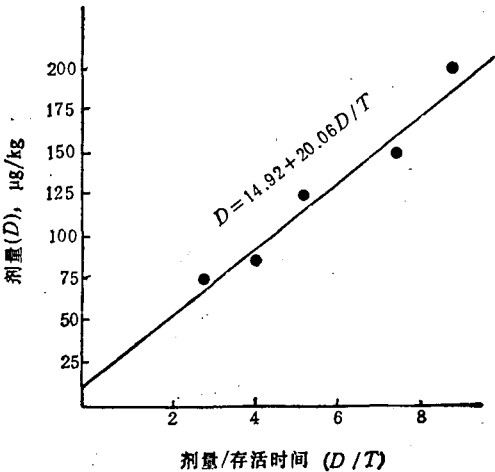


图1 蓖麻毒素 LD₅₀ 测定求算图(5 只小鼠)

存活时间和计算步骤列于表 1、2。求得回归直线的纵轴截距 (LD₅₀) 为 1.35mg/kg, SD = 0.39mg/kg, LD₅₀ 的 95% 可信区间

$$\beta' = b \pm t_{1-\alpha/2} \cdot SD_b \cdot \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{L_{xx}}}$$
$$= 1.35 \pm 0.563 \text{mg/kg},$$

经统计检验表明,回归直线有极显著意义 ($P < 0.01$) (图 3)。

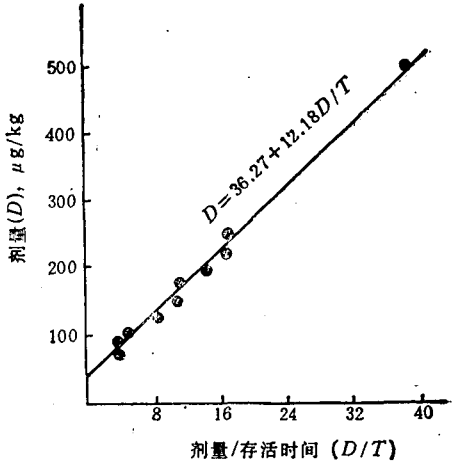


图2 蓖麻毒素 LD₅₀ 测定求算图(10 只小鼠)

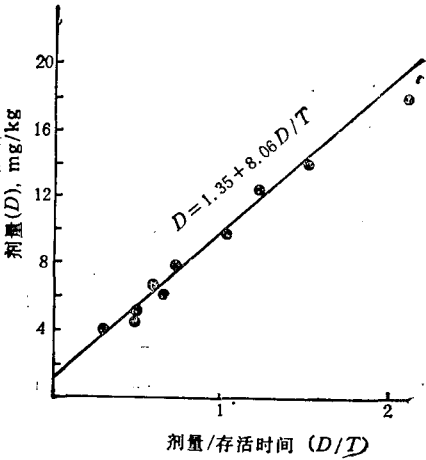


图3 蓖麻凝集素 LD₅₀ 测定求算图

讨 论

文献报道的蓖麻毒素和凝集素的 LD₅₀ 值都是用经典方法测定的。由于牺牲大量的动物,可能对统计结果的精确性和重现性有所贡

表2 统计计算表

统 计 值	计 算 步 骤	蓖 麻 毒 素		蓖麻凝集素
动物数	A	5	10	10
统计量				
S_x	B	28.06	125.18	9.25×10^3
S_{x^2}	C	181.81	2497.21	11.49×10^6
S_y	D	637.50	1887.50	88.00×10^3
S_{y^2}	E	91406.25	495156.25	967.5×10^6
S_{xy}	F	4065.81	34961.63	105.0×10^6
$S_{(x-\bar{x})^2} = L_{xx}$	$G = C - (B^2:A)$	24.34	930.21	2.93×10^6
$S_{(x-\bar{x})(y-\bar{y})} = L_{xy}$	$H = F - (B \cdot D:A)$	488.16	11333.91	23.60×10^6
$S_{(y-\bar{y})^2} = L_{yy}$	$J = E - (D^2:A)$	10125.00	138890.63	193.10×10^6
$L_{xy}^2:L_{xx}$	$K = H^2:G$	9790.48	138095.18	190.09×10^6
$L_{yy} - L_{xy}^2:L_{xx}$	$L = J - K$	334.52	795.45	3.01×10^6
平均数				
$\bar{x} = \frac{1}{n} S_x$	$M = B:A$	5.61	12.52	0.925×10^3
$\bar{y} = \frac{1}{n} S_y$	$N = D:A$	12.50	188.75	8.80×10^3
回归系数				
$a = L_{xy}:L_{xx}$	$P = H:G$	20.06	12.18	8.06
$b = \bar{y} - a \cdot \bar{x}$ (即 LD_{50})	$Q = N - M \cdot P$	14.92	36.27	1.35×10^3
标准差				
$SD_a = \sqrt{\frac{1}{n-2} \left(L_{yy} - \frac{L_{xy}^2}{L_{xx}} \right)}$	$R = \sqrt{L:(A-2):G}$	2.14	0.327	0.36
$SD_b = \sqrt{\frac{1}{n-2} \left(L_{yy} - \frac{L_{xy}^2}{L_{xx}} \right) \left(\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{L_{xx}} \right)}$	$S = \sqrt{R^2 \cdot C:A}$	12.90	5.17	0.39×10^3

$$x = D/T; y = D$$

献,但由于影响 LD_{50} 的因素很多,所以各实验室报道的数据有一定的差异^[5-11]。本文采用简易的方法来测定蓖麻毒素和凝集素的 LD_{50} 值,其结果与大多数文献值十分接近。作者发现该法不仅具所用动物少、简易、快速的优点,而且具有较高的精确性。其可能原因分析如下:

1. 因为蓖麻毒素和凝集素的毒性虽强,但毒性作用的机理是通过与细胞膜受体结合、吞噬、亚基裂解并透过溶酶体膜、抑制胞浆中蛋白质合成等一系列过程发生的,所以其毒性作用发生比较缓慢^[12]。经典 LD_{50} 法测定时,与观察时间的长短有密切关系。蓖麻毒素 LD_{50} 测定时,一般作者取 72 小时^[9],但有的作者采用 48 小时^[10],这样观察到的死亡概率有较大的差异,所得到的 LD_{50} 值亦有差异。究竟取多长时间更科学还值得探讨。而简易法不存在观察时间问题,可以排除这一因素的影响。因为该

法设置的剂量较大,所有小鼠都必然死亡,只与存活时间有关。实际上,回归直线 $D = b + aD/T$ 与纵轴的截距的几何意义就是当时间无限长时,杀死一半动物所需的最小剂量, Molinengo 把它定义为 LD_{50} 值。

2. 毒性作用发生较快的药物,由于计算注射和死亡时间判断上的困难,而造成较大的误差。例如,有的动物几分钟内死亡,而垂死状况可持续 1—2min,难以计算精确的存活时间。当采用这一方法时,就造成较大的误差。而当用蓖麻毒素和凝集素测定时,因为存活时间一般在 10 多小时左右,可见几分钟的误差几乎不影响结果的可靠性,得到数据的线性关系较好,其标准差亦比较小。

作者认为这种简易测定法有较可靠的理论和实验依据,所用动物少,且可获得经典 LD_{50} 法 (下转第 225 页)

冲液含 10mmol/L Tris-HCl, pH8.3; 50mmol/L KCl; 1.5mmol/L MgCl₂; 0.3mmol/L dATP; 0.3mmol/L dCTP; 0.3mmol/L dGTP; 0.3mmol/L dTTP; 0.4μmol/L PC₁₁-PC₁₂; 0.4μmol/L PC₁₃-PC₁₄; 1U Taq 多聚酶。溶液上层加 50μl 液体石蜡后将试管先后置于 95℃ 水浴 1min, 56℃ 水浴 2min, 72℃ 水浴 3min, 重复以上循环 20 次。移去液体石蜡, 水相用酚/氯仿抽提一次。抽提后加醋酸铵, 终浓度为 0.3mol/L。用无水乙醇沉淀 DNA。将 DNA 溶解后用 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。经 EB 染色在光密度仪下分析, 可获得两种目的基因扩增后的拷贝数量之比。

结果与讨论

为了能清楚地观察多个目的基因经 PCR 扩增后在拷贝数量上的差异, 我们选用两个分别带有不同目的基因的质粒 pCER204 (6.3kb) 和 pUC-2γ-β (5.9kb)。同时为了将来适于检测癌组织总 DNA 中癌基因扩增的需要, 所选用的目的基因 C-erbB-2/HER-2 原癌基因的扩增片段是一段与人表皮生长因子受体(EGFR)、大鼠表皮生长因子受体(neu)均不同源的区域^[6-9]。选用的另一目的基因 γ-IVS-II 是在邻近 γ 珠蛋白第二外显子的一段高度保守的插入序列, 以便作为将来单拷贝基因拷贝量扩增的标准, 同时也避免由于人珠蛋白多态现象所造成的干扰。采用一系列重量比滴度 PCR 扩增体系, 在同样的条件下做 20 次 PCR 循环。电泳后可检测到两个被测目的基因, 或同一目的基因因拷贝含量不同经 PCR 放大作用后的明显差异 (图 1 见图版 IV)。而且扩增前后两种

目的基因含量的比是正相关的。需要说明的是由于本文所选用的两个带有目的基因的质粒分子大小相近 (pCER204:pUC-2γ-β = 1.06:1), 所以本文以两种质粒的重量比代替了拷贝数量比。在实际应用中由于人细胞染色体总 DNA 中非扩增的单拷贝基因的拷贝量均是相同的, 经 PCR 扩增时只要所加各种引物量准确一致, 其实验结果是能够准确反映被测目的基因与单拷贝标准基因在拷贝数量上的差异。

实验表明, 在选择好相应引物的条件下, 可以对同一种组织总 DNA 中两个以上的目的基因同时扩增。在扩增体系中可选择任何一个在遗传结构上稳定的单拷贝基因作为参照基因, 以便检测其它被测目的基因在拷贝量上的变化^[10]。另外与其它检测基因扩增的方法相比, 此方法具有所需 DNA 样品量少、灵敏、不使用同位素、安全等优点。尤其对于为观察细胞株而制备的小量样品或石蜡包埋及福尔马林处理后的组织切片中某种基因的扩增更是一种行之有效的办法。它可做作为一种辅助诊断的手段推广到临床实验室使用。

参考文献

- 1 Zrene Garcia *et al.* *Cancer Research*, 1989, 49: 6675
- 2 Kentaro Semba *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 83: 6497
- 3 Joo-Bao Park *et al.* *Cancer Research*, 1989, 49: 6605
- 4 Gina Kolatl. *Science*, 1987, 235: 160
- 5 刘敬忠. 中国医学科学院报, 1988, 10: 411
- 6 Tadashi Yamamoto *et al.* *Nature*, 1986, 319: 230
- 7 Jerry L Slighon *et al.* *Cell*, 1980, 230: 1350
- 8 Saiki R K *et al.* *Science*, 1985, 230: 1350
- 9 Cornelia I Bargman *et al.* *Nature*, 1986, 319: 226
- 10 Roy A Frye *et al.* *Oncogene*, 1989, 4: 1153

[本文于 1990 年 2 月 13 日收到, 5 月 15 日修回]

(上接第 221 页)

所得到的几乎全部统计信息。特别适用于蓖麻毒蛋白这类中毒作用慢、毒性强的毒蛋白的急性毒性试验。

参考文献

- 1 徐叔云等. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 400
- 2 Molinengo L. *J Pharm Pharmacol*, 1979, 31: 343
- 3 Beccari E. *Nature*, 1949; 163: 534

- 4 Meier J, Theakston RDC. *Toxicon*, 1986; 24: 395
- 5 Nicolson GL, Blaustein J. *BBA*, 1972; 266: 543
- 6 Lin JY *et al.* *Nature*, 1970; 227: 292
- 7 Olsnes S, Pihl A. *Biochemistry*, 1973; 12: 312
- 8 李士云, 王克夷. 生物化学与生物物理学报, 1981; 13: 545
- 9 喻梅辉等. 生物化学与生物物理进展, 1983; (4): 66
- 10 Lin JY, Lin SY. *Toxicon*, 1986; 24: 757
- 11 张振范等. 生物化学杂志, 1989; 5(6): 486
- 12 詹金彪. 实用肿瘤杂志, 1989; 4(1): 58

[本文于 1990 年 3 月 9 日收到, 5 月 31 日修回]