

黄芪总黄酮对 DNA 损伤防护作用的研究

汪德清 沈文梅 田亚平 蒋赐恩

(解放军总医院生化科, 北京 100853)

摘要 用 DNA 解旋荧光检测法 (FADU) 研究了黄芪总黄酮 (TFA) 对 γ 射线和 H_2O_2 所致 V79 细胞 DNA 链断裂的防护作用. 结果表明 TFA 对这两种损伤因子所致的 DNA 损伤均有不同程度的防护作用, 当 TFA 浓度达到 0.4 g/L 和 0.6 g/L 时, 分别对 H_2O_2 和 γ 射线所致的损伤有保护作用 ($P < 0.05$), 而浓度增至 0.8 g/L 和 1.2 g/L 时, 分别对两种因素所致的 DNA 链断裂损伤有非常显著的防护效果 ($P < 0.01$), 对 H_2O_2 的防护效果优于对 γ 射线.

关键词 黄芪总黄酮, γ 射线, 过氧化氢, DNA 损伤

DNA 是电离辐射和某些化学物质攻击的主要靶分子之一^[1,2], 其链断裂是常见的损伤类型, 这种损伤轻者可通过细胞内的某些机制自行修复, 重者就会引起基因突变甚至细胞死亡^[3,4]. 因此, DNA 损伤的防护研究, 对肿瘤、辐射损伤等疾病的临床预防和治疗都具有十分重要的意义. 本文采用 DNA 解旋的荧光检测法 (fluorometric assay of DNA unwinding, FADU) 观察了黄芪总黄酮 (total flavonoids of *Astragalus*, TFA) 对 γ 射线和 H_2O_2 所致 V79 细胞 DNA 链断裂的防护作用.

1 材料和方法

1.1 细胞培养

V79 细胞于含 10% 小牛血清的 1640 培养基中, 加入终浓度为 100 IU/ml 的青霉素和 100 mg/L 的链霉素, 37°C 培养.

1.2 药物和射线

TFA 系本室参照文献 [5, 6] 从蒙古黄芪 (*Astragalus mongholius* Bunge) 中分离提取, 军事医学科学院二所鉴定, 用前以生理盐水溶解, 过滤, 0.1 MPa 高压灭菌, 4°C 冰箱保存备用; H_2O_2 为天津东方化工厂产品; 其余为国产分析纯试剂. 照射条件: 0~4°C ^{60}Co 辐照, 剂量率为 74.94 Gy/s.

1.3 实验分组

收集对数生长期细胞, 用 PBS 制成 10^6 /ml 细胞悬液, 分处理组和对照组. 对照组设 T (未变性)、B (空白)、和 P (部分变性) 3 组, 处理组只设 Pi (部分变性) 组, 每组 4 个平行管, 0.2 ml/管.

1.4 DNA 损伤检测方法

1.4.1 试剂: 裂解液 (1% NP-40, 0.15 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA- Na_2 , 50 mmol/L Tris, 0.1% BSA), 变性液 I (0.45 体积裂解液溶于 0.2 mol/L NaOH), 变性液 II (0.4 体积裂解液溶于 0.2 mol/L NaOH), 抗变性液 (1 mol/L 葡萄糖, 14 mmol/L 的巯基乙醇), 溴化乙锭液 (1.0 mg/L EB, Fluka Chemie AG, 13.3 mmol/L NaOH).

1.4.2 仪器: CPS-1A 超声波粉碎机, 日立 850-荧光分光光度计.

1.4.3 检测过程: 处理组 (辐射和药物处理) 和对照组, 每管加入 0.2 ml 的裂解液, 0°C, 10 min, 细胞裂解后, T 管加入抗变性液 0.4 ml, 余下各管小心加入变性液 I、II 各 0.1 ml (B 管加入变性液立即用超声波处理 30 s), 避光, 0°C, 30 min; B、P (Pi) 组加

入抗变性液 0.4 ml/管, 将所有实验管置 15℃ 孵育 30 min 后, T、P (Pi) 超声处理 10 s, 使其均匀, 加入溴化乙锭液, 立即测定各管荧光强度 (激发光 520 nm, 发射光 590 nm).

1.4.4 数据处理: 以公式 $D\% = [(P - B) \div (T - B)] \times 100\%$, 计算 DNA 双链残存的百分数 (D_0 : 未处理细胞 D 值; D_i : 处理细胞 D 值), 为获得直线型量效关系曲线, 引入 Q_d 值. $Q_d = 100(\lg D_0 - \lg D_i)$, Q_d 值的大小表示 DNA 链断裂的程度^[7,8].

2 结 果

2.1 细胞量与相对荧光强度的关系

一定量对数生长期细胞, 行上述处理后, 其相对荧光强度见图 1, 从图 1 中可知在 $0.5 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ 细胞量的条件下, 细胞 DNA 量与其相对荧光强度成线性关系. $r = 0.923$, 以下实验选用 2×10^5 细胞每个样品.

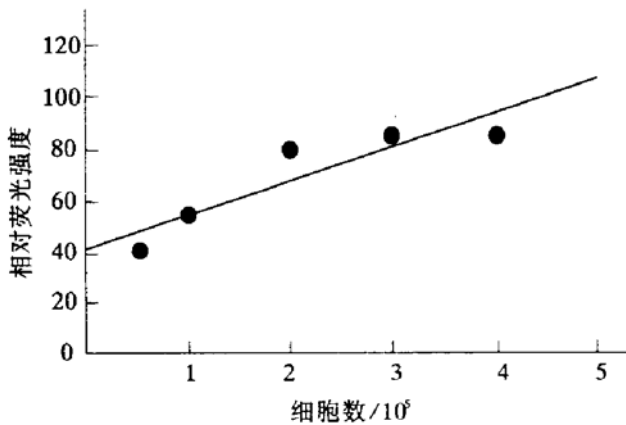


图 1 V79 细胞量 DNA 与 EB 荧光值的关系

2.2 不同浓度的 H₂O₂ 所致 DNA 链断裂

在样品中加入终浓度为 0.05 ~ 0.25 mol/L H₂O₂, 37℃, 水浴 15 min 后, 离心去上清, 立即用 FADU 法检测 V79 细胞 DNA 链断裂, 结果表明, H₂O₂ 浓度为 0.05 ~ 0.25 mol/L 时, H₂O₂ 浓度与 DNA 损伤程度之间有良好的线性关系, $r = 0.986$.

2.3 TFA 对 H₂O₂ 所致 DNA 链断裂的影响

V79 细胞 (10^6 /ml) 加入 TFA (终浓度 0.08 ~ 0.8 g/L) 后, 加入终浓度为

0.2 mmol/L 的 H₂O₂, 37℃, 水浴 15 min 后, 离心去上清, 立即检测 DNA 链断裂. 结果表明 TFA 对 H₂O₂ 所致 V79 细胞 DNA 链断裂有明显保护作用 (图 2).

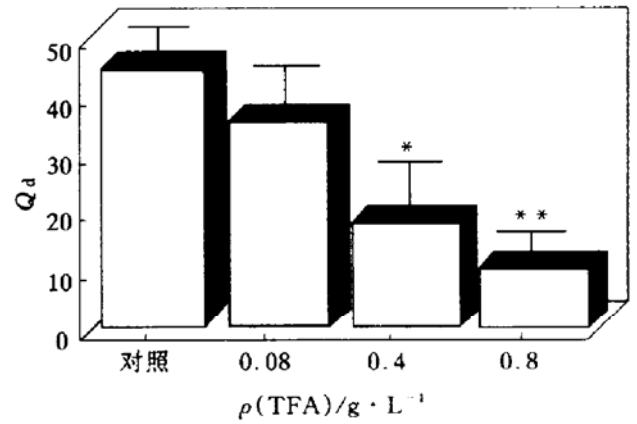


图 2 TFA 对 H₂O₂ 所致 V79 细胞 DNA 链断裂的影响

$n = 4$, 与对照比较; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.4 γ 射线照射对 V79 细胞 DNA 的损伤

对数生长期 V79 细胞 (10^6 个/ml), 冰浴 10 min 后照射, 然后用 FADU 法检测 DNA 链断裂, 结果表明, 在照射剂量为 2 ~ 10 Gy 时, 照射剂量与 DNA 损伤程度之间的线性关系良好, $r = 0.984$.

2.5 TFA 对 γ 射线所致 DNA 链断裂的影响

在样品中加入 TFA (终浓度为 0.12 ~ 1.2 g/L), 冰浴 10 min, 用 6 Gy 剂量的 γ 射线照射, 照射后离心, 去上清, 立即用荧光法

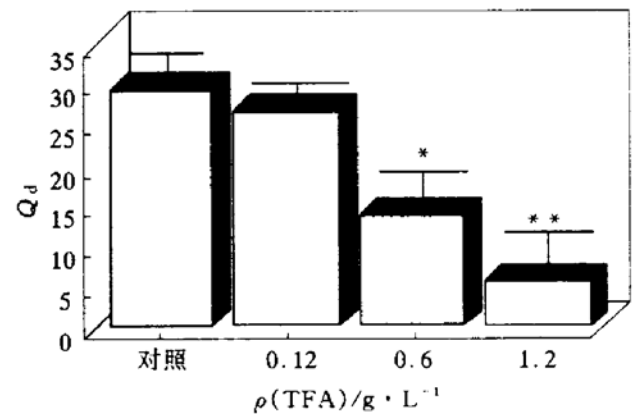


图 3 TFA 对 γ 射线所致 V79 细胞 DNA 链断裂的影响

$n = 4$, 与对照比较; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

测定DNA链断裂,结果见图3.结果表明,TFA浓度为0.6 g/L时即对DNA损伤有保护作用,当浓度达1.2 g/L时,TFA对 γ 射线所致DNA链断裂损伤有非常显著的防护效果.

3 讨 论

FADU法是建立于DNA双螺旋遇碱会发生解旋;在有DNA链断裂时解旋速度加快;EB可特异性嵌入DNA双螺旋,使荧光增强.已知 H_2O_2 对DNA的损伤主要与结合在DNA上的二价金属离子(Fe^{2+} 或 Cu^{2+})发生反应,生成 $\cdot OH$, $\cdot OH$ 直接引起DNA损伤^[9]. γ 射线除直接能量损伤DNA大分子外,还电离激发水分子,生成 $\cdot OH$ 等自由基,自由基与DNA作用,引起DNA功能改变和链断裂,也是其损伤机理之一^[10].

结果表明,无论 H_2O_2 还是 γ 射线所致的细胞DNA链断裂,TFA均有显著的防护作用.我们以往的实验证明,TFA具有显著清除 O_2^- 和 $\cdot OH$ 等多种自由基的功能^[11],而在这两种损伤模型中均有 $\cdot OH$ 的生成,所以我们推测TFA对 $\cdot OH$ 的清除作用是防护 H_2O_2 和 γ 射线所致细胞DNA链断裂的主要机理之一.但亦有实验报道,照射机体时,30%~70%的DNA损伤是由辐射能直接引起^[10].因此,从以上结果看,TFA除具有直接清除 $\cdot OH$ 作用而起到抗辐射效果外,是否具有对抗辐射能直接损伤DNA的作用,尚需进一步研究.

DNA损伤与基因突变是机体衰老的主要机制,研究传统的抗衰老药物黄芪对DNA损伤保护作用,可从分子生物学水平为黄芪的抗衰老作用提供了理论依据.

参 考 文 献

- 1 Frachet B J, Spothem M M, Sabbattier R *et al.* Biochemistry, 1993; 32 (8): 2104
- 2 Brent J A, Rumack B H. Clinical toxicology, 1993; 31 (1): 139
- 3 Prise K M, Davies S, Stratford M R *et al.* Int J Radiat Biol, 1992; 62 (3): 297
- 4 Nguyen T, Brunson D, Crespi C L *et al.* Proc Natl Acad Sci

USA, 1992; 89 (7): 3030

- 5 贺正全, 王宝琴. 药学学报, 1991; 25 (9): 694
- 6 王志学, 马启凤, 何群等. 中草药, 1983; 14 (3): 1
- 7 Birboim H C, Jevcak J J. Cancer Res, 1981; 41 (5): 1889
- 8 贺涛, 夏寿萱. 辐射研究与辐射工艺学报, 1990; 8 (4): 193
- 9 Bannister W H, Bannister J V. Biological and clinical aspects of superoxide dismutase. New York: Elsevier-North Holland, 1980: 1~31
- 10 陈瑗, 周玫. 自由基医学. 北京: 人民军医出版社, 1991: 362~370
- 11 汪德清, 沈文梅, 田亚平等. 中国药理学通报, 1994; 10 (2): 129

Protective Effect of Total Flavonoids Astragalus on DNA Strand Breaks in V79 Cells Induced by Hydrogen Peroxide and Gamma Rays. Wang Deqing, Shen Wenmei, Tian Yaping, Jiang Cien (*Department of Biochemistry, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China*).

Abstract The protective effect of total flavonoids *Astragalus* (TFA), one of the natural anti-oxide agent isolated from *Astragalus mongholicus*, on DNA strand breaks induced by the hydrogen peroxide and gamma rays has been investigated with the fluorometry assay of DNA unwinding (FADU). The results showed that the TFA has different degree of protective effect on DNA strand breaks caused by hydrogen peroxide and gamma rays respectively. It also showed some protective effect on DNA strand breaks induced by these two damage factors, when the concentration of TFA were 0.4 g/L and 0.6 g/L, respectively. When its concentrations were increased to 0.8 g/L and 1.2 g/L, TFA could effectively protect DNA from hydrogen peroxide and gamma rays damages. Compared the protective effect of TFA on DNA strand breaks induced by hydrogen peroxide and gamma rays, the former was better. The protective mechanism of TFA on DNA strand break could be related to scavenging free radicals.

Key words total flavonoids *Astragalus*, gamma rays, hydrogen peroxide, DNA damage