

Ames 实验及彗星实验检测辅酶 NADH 的抗突变作用

温居一 孙海 张积仁*

(南方医科大学珠江医院肿瘤中心, 广州 510282)

摘要 采用 Ames 实验及单细胞凝胶电泳 (SCGE, 彗星实验), 对还原型辅酶 NADH 进行抗突变研究。NADH 中、高剂量组在加或不加 S9 的情况下, 均能不同程度地抑制由致突变物引起的 TA98、TA100 回变菌落数的增加, 降低 SCGE 拖尾细胞率。表明还原型辅酶 NADH 具有一定的抗突变作用。

关键词 NADH 抗突变作用; Ames 实验; 彗星实验

辅酶 NADH 是呼吸链电子传递和能量代谢过程重要辅酶, 参与细胞氧化还原反应和调节膜受体的表达。近年来研究结果表明 NADH 与细胞生长、增殖、分化和细胞凋亡有关。能够抑制化疗药物顺铂、阿霉素和细胞毒药物鱼藤酮等的细胞毒作用^[1,2]。可以防护和修复因化学、辐射及缺血缺氧造成的细胞损伤^[3,4]。但对其可能存在的抗突变作用尚缺乏系统的研究。本试验采用 Ames 实验及单细胞凝胶电泳 (SCGE, 彗星实验), 对 NADH 进行抗突变研究。

1 材料与方法

1.1 材料

受试物: β -NADH 由奥地利 Graz 大学化学系和维也纳贝克曼研究所 Birkmayer 教授提供。0.2 mol/L, pH 7.4 磷酸盐缓冲液配制不同浓度剂量。

试验菌株: his⁻ 型鼠伤寒沙门氏菌: TA98: 主要性状为 his_{D3052}AP^{rfa} Δ uvrB; TA100: 主要性状为 his_{G46}AP^{rfa} Δ uvrB; 经 his⁻、生物素缺陷型、脂多糖屏障(rfa)突变、DNA 修复系统缺失突变(Δ uvrB)、抗氨基青霉素 R 因子和自发回变菌落数目等项性状鉴定, 菌株均合格。

S9: 大鼠肝匀浆微粒体酶, 主要成分为细胞色素 P450。新鲜配制, 宰杀动物前按每公斤体重腹腔注射诱导物五氯联苯油溶液 2.5 ml (五氯联苯用玉米油配制, 浓度为 200 mg/ml) 以提高酶活力。

细胞株: 正常人肝细胞株 L02, 购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库。

1.2 方法

1.2.1 Ames 实验 采用平板掺入法^[5], 设 NADH

低剂量组(200 μ g/ml NADH+ 致突变物)、NADH 中剂量组(400 μ g/ml NADH+ 致突变物)、NADH 高剂量组(600 μ g/ml NADH+ 致突变物), 阴性对照组(蒸馏水), 致突变物阳性对照组。

致突变物选择及剂量: 加 S9, TA98: 2.5 μ g/ml 黄曲霉素 B1(AFB1); TA100: 20 μ g/ml 黄曲霉素 B1(AFB1)。不加 S9, TA98: 0.5 μ g/ml 二乙基亚硝胺(DENA); TA100: 2.5 μ g/ml 叠氮钠(NaN_3)。

用如下三种方法进行试验:

方法一: 受试物直接灭活致突变物。0.1 ml 致突变物及 0.1 ml 受试物同时加入 0.5 ml 磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 7.4), 加或不加 S9, 于 37 $^{\circ}$ C 水浴, 预培养 20 min, 再加入 0.1 ml 菌液。

方法二: 受试物抑制致突变物对菌株的致突变作用。0.1 ml 受试物、0.1 ml 致突变物与 0.1 ml 菌液共同加入 0.5 ml 磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 7.4), 加或不加 S9, 于 37 $^{\circ}$ C 水浴, 预培养 20 min。

方法三: 受试物抑制已受致突变作用的菌株的突变表达。0.1 ml 致突变物与 0.1 ml 菌液同时加入 0.5 ml 磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 7.4), 加或不加 S9, 于 37 $^{\circ}$ C 水浴预培养 20 min, 然后离心(1000 r/min, 5 min), 再用磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 7.4)冲洗两次, 洗后剩 0.7 ml 菌液, 再加入 0.1 ml 受试物。

以上三种方法的悬液均先取适量做细菌存活试验, 其余分别加入 2 ml 融化的(45 $^{\circ}$ C 水浴)顶层培

收稿日期: 2005-04-19 接受日期: 2005-08-26

全军医学科研“十五”计划基金资助项目(No.01MA138)

* 通讯作者。Tel: 020-61643200, Fax: 020-61643200, E-mail: zhangjiren@126.com

培养基, 迅速倾入底层培养基, 平放固化, 37 °C 培养 48 h。计数各平皿回变菌落数, 计算平均相对回变菌落数及抑制率。

抑制率 = (致突变物对照组相对回变菌落数 - NADH 组相对回变菌落数) / (致突变物对照组相对回变菌落数 - 阴性对照组相对回变菌落数) × 100%。

1.2.2 单细胞凝胶电泳(SCGE, 彗星实验) 按文献[6]的方法进行彗星实验(SCGE)。选取二乙基亚硝胺(DENA)为致突变物。正常人肝细胞株 L02 在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养至对数生长期, 胰蛋白酶消化, 离心, 弃上清, 细胞重悬于无血清 RPMI 1640 培养基中, 调节细胞浓度至 2 × 10⁵ 个/ml。分装于 5 ml 离心管中, 如下分组处理: 低剂量组(200 μg/ml NADH+2.5 × 10⁻⁴ mg/ml DENA)、中剂量组(400 μg/ml NADH+2.5 × 10⁻⁴ mg/ml DENA)、高剂量组(600 μg/ml NADH+2.5 × 10⁻⁴ mg/ml DENA), 阳性对照组(2.5 × 10⁻⁴ mg/ml DENA), 阴性对照组(RPMI 1640 培养液)。暴露 1.5 h, 离心, 收集细胞。

以拖尾细胞率和拖尾细胞尾长为观测指标, 每组计数 200 个细胞, 记录拖尾细胞数, 计算拖尾细胞率(%) = (拖尾细胞数 / 200) × 100%。目镜测微尺测量拖尾细胞的尾长。

1.3 统计学处理

使用 SPSS10.0 统计软件, 多组均数的比较采

用方差分析(One-way ANOVA), 率的比较使用 χ^2 检验。P < 0.05, 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ames 实验检测 NADH 的抗突变性

在受试物直接灭活致突变物试验中, 加 S9 的情况下, NADH 中、高剂量组 TA98 的相对回变菌落数分别为: 658±49 和 507±52, 抑制率分别为: 35.1% 和 50.8%; TA100 的相对回变菌落数分别为: 775±106 和 452±89, 抑制率分别为: 51.9% 和 77.9%。与致突变物阳性对照组相比相对回变菌落数均明显减少, 抑制率升高, 差异有统计学意义。不加 S9 的情况下, 两个菌株的相对回变菌落数及抑制率与致突变物阳性对照组相比无差异。表明在 S9 存在的情况下, 辅酶 NADH 可以直接灭活致突变物, 从而发挥抗突变作用。详见表 1。

在受试物抑制致突变物对菌株的致突变作用试验中, 加或不加 S9 的情况下, NADH 中、高剂量组 TA98、TA100 两个菌株的相对回变菌落数与致突变物阳性对照组相比均明显减少, 抑制率均升高, 对 TA98 的突变抑制率最高达 62.5%, TA100 的突变抑制率最高达 86.3%。差异有统计学意义。说明 NADH 中、高剂量组, 在加或不加 S9 的情况下, 均能不同程度地抑制致突变物对菌株的致突变作用。详见表 2。

表 1 直接灭活致突变物试验

组别	TA98				TA100			
	加 S9		不加 S9		加 S9		不加 S9	
	相对回变菌落数	抑制率(%)	相对回变菌落数	抑制率(%)	相对回变菌落数	抑制率(%)	相对回变菌落数	抑制率(%)
阴性对照	33.5±4.2		32±6.8		178±18.6		166±24.0	
NADH 低剂量组	982±64	1.5	1229±86	0.3	1306±98	9.1	1376±152	-9.8
NADH 中剂量组	658±49*	35.1*	1207±97	2.1	775±106**	51.9**	1204±89	5.8
NADH 高剂量组	507±52**	50.8**	1128±102	8.7	452±89**	77.9**	1093±102	15.9
致突变物阳性对照	996±91		1232±89		1419±105		1268±97	

与致突变物阳性对照组相比, *P < 0.05, **P < 0.01。结果为 5 皿的 $\bar{x} \pm s$ 。

表 2 NADH 抑制致突变物对菌株的致突变作用

组别	TA98				TA100			
	加 S9		不加 S9		加 S9		不加 S9	
	相对回变菌落数	抑制率(%)	相对回变菌落数	抑制率(%)	相对回变菌落数	抑制率(%)	相对回变菌落数	抑制率(%)
阴性对照	33.5±4.2		32±6.8		178±18.6		166±24.0	
NADH 低剂量组	974±60	2.3	1239±105	-0.5	1325±101	7.6	1204±152	5.8
NADH 中剂量组	626±39*	38.4*	946±85*	23.8*	525±32**	72.0**	572±89**	63.2**
NADH 高剂量组	394±58**	62.5**	585±42**	53.9**	348±34**	86.3**	386±29**	80.0**
致突变物阳性对照	996±91		1232±89		1419±105		1268±97	

与致突变物阳性对照组相比, *P < 0.05, **P < 0.01。结果为 5 皿的 $\bar{x} \pm s$ 。

表3 NADH 抑制已受致突变作用的菌株的突变表达

组别	TA98				TA100			
	加 S9		不加 S9		加 S9		不加 S9	
	相对回变菌落数	抑制率(%)	相对回变菌落数	抑制率(%)	相对回变菌落数	抑制率(%)	相对回变菌落数	抑制率(%)
阴性对照	33.5±4.2		32±6.8		178±18.6		166±24.0	
NADH 低剂量组	987±60	0.9	1224±83	0.6	1341±99	6.3	1246±112	2.0
NADH 中剂量组	991±46	0.5	1210±96	1.8	1259±102	12.8	1318±84	-4.5
NADH 高剂量组	683±52*	32.5*	1229±89	0.3	852±89*	45.7*	1067±79	18.2
致突变物阳性对照	996±91		1232±89		1419±105		1268±97	

与致突变物阳性对照组相比, * $P < 0.05$ 。结果为 5 皿的 $\bar{x} \pm s$ 。

在抑制已受致突变作用的菌株的突变表达试验中, 只有 NADH 高剂量组, 在加 S9 的情况下, 两个菌株的相对回变菌落数与致突变物阳性对照组相比减少, 抑制率升高, 对 TA98 和 TA100 的突变抑制率分别为 32.5% 和 45.7%。差异有统计学意义。说明对于已受致突变作用的菌株, 只有使用高剂量 NADH, 且加 S9 活化的情况下, 才能有一定的抗突变作用。详见表 3。

2.2 SCGE 彗星试验结果

阳性对照组经 2.5×10^{-4} mg/ml DENA 暴露处理, 可见由于细胞 DNA 受损, 电泳时细胞出现荧光拖尾现象(图略)。拖尾细胞率为 97%, 拖尾细胞尾长(45.9 ± 3.8) μm , 与阴性对照组相比, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。而 NADH 高剂量组与 DENA 阳性对照组相比, 拖尾细胞率明显降低, 为 47%, 拖尾细胞尾长缩短, 为(21.5 ± 2.9) μm , 差异有统计学意义($P < 0.01$)。NADH 中剂量组拖尾细胞率也有降低, 为 64% ($P < 0.01$)。低剂量组和与阳性对照组相比, 拖尾细胞率和拖尾细胞尾长均无明显差异。

3 讨论

Ames 试验是利用鼠伤寒沙门氏菌的组氨酸营养缺陷型菌株(his⁻)的回复突变性来检测化学物质致突变作用的一种简便、快速、灵敏的方法。经修改, 可以用来研究受试物的抗突变作用。TA98 和 TA100 是分别用来检测 DNA 分子移码型和碱基置换型突变的两种敏感菌株^[7]。通过受试物直接灭活致突变物试验发现, 在哺乳动物微粒体酶(大鼠 S9)存在的情况下, NADH 可以使 TA98、TA100 两个菌株的相对回变菌落数明显减少, 具有一定的抑制突变作用。不加 S9, 则无明显的抑制突变作用。说明 NADH 加 S9 可以直接灭活致突变物。可能是由于 S9 的主要成分是细胞色素 P450, 而 NADH 作为呼吸链中重要的辅酶, 在其和 S9 的共同作用下, 将致突

表4 彗星试验(SCGE)结果

组别	拖尾细胞率(%)	拖尾细胞尾长(μm)
阴性对照	5.0	5.6±4.2
DENA 阳性对照	97.0*	45.9±3.8*
NADH 低剂量组	98.0	44.0±5.5
NADH 中剂量组	64.0*	35.6±4.7*
NADH 高剂量组	47.0*	21.5±2.9*

与 DENA 阳性对照组相比, * $P < 0.01$; 与阴性对照组相比, * $P < 0.01$ 。

变物转变为对 DNA 无损伤效应或损伤效应小的物质所致。NADH 中、高剂量组, 在加或不加 S9 的情况下, 均能不同程度地抑制致突变物对菌株的致突变作用。NADH 高剂量时, 对 TA98 的突变抑制率最高达 62.5%, TA100 的突变抑制率最高达 86.3%。说明 NADH 对移码型和碱基置换型突变均有抑制作用。而对于已受致突变作用的菌株, 只有使用高剂量 NADH, 且加 S9 活化的情况下, 才能有一定的抗突变作用。对 TA98 和 TA100 的突变抑制率分别为 32.5% 和 45.7%。

在彗星实验(SCGE)中, 细胞核 DNA 突变受损愈重, 产生的断链或变性断片就愈多, 其断链或断片也就愈小, 在电场作用下迁移的量多, 距离长, 表现为尾长增加和尾部荧光强度增强。因此, 通过测定 DNA 断片的迁移长度(拖尾细胞尾长)就可定量测定单个细胞 DNA 损伤程度。通过试验可以看出, NADH 可减轻致突变剂 DENA 对正常人肝细胞株 L02 的损伤, 降低细胞突变率。

以上试验结果表明, 还原型辅酶 NADH 具有一定的抗突变作用, 可以抑制一些诱变剂和致癌剂所致的突变, 保护遗传物质 DNA 免受损伤。其具体的抗突变作用机制, 尚需进一步研究。并且外源性添加 NADH 后, 其在体内的代谢、利用和作用功能, 尚需进行动物实验来深入研究和探讨。

参考文献(References)

- [1] Zhang JR *et al. J Tumor Marker Oncol*, 1998, **13**: 5
[2] 张积仁等。《解放军医学杂志》, 2002, **27**: 192
[3] Liu FQ *et al. World J Gastroenterol*, 2003, **9**: 1781
[4] 徐小平等。《中华实验外科杂志》, 2002, **19**: 186
[5] 卫生部卫生监督司。《保健食品功能学评价程序和检验方法》, 1996
[6] McKelvey-Martin VJ *et al. Mutation Res*, 1993, **288**: 47
[7] Ames BN *et al. Mutat Res*, 1975, **31**: 347

The Anti-mutagenicity of Reduced Coenzyme NADH by Ames Assay and Comet Assay

Ju-Yi Wen, Hai Sun, Ji-Ren Zhang*

(Department of Oncology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China)

Abstract The anti-mutagenicity of reduced coenzyme NADH was studied by Ames assay and single cell gel electrophoresis assay (SCGE, comet assay). The results showed that the increasing of the frequency of revertant colonies caused by treating TA98, TA100 with positive mutagens could be inhibited by the middle and high dose of reduced coenzyme NADH, with or without S9. The comet assay showed that the length of DNA migration (the length of the tail of comet cells) and the percentage of migrated DNA were decreased by the middle and high dose of NADH. It indicates that the reduced coenzyme NADH might be able to inhibit mutagenesis caused by mutagens.

Key words reduced coenzyme NADH; anti-mutagenicity; Ames assay; comet assay

Received: April 19, 2005 Accepted: August 26, 2005

This work was supported by the Tenth Five-Year Plan of Military Medical Research (No.01MA138)

*Corresponding author. Tel: 86-20-61643200, Fax: 86-20-61643200, E-mail: zhangjiren@126.com